

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)

VI. 加速器質量分析(AMS)の 薬物動態試験への応用研究

池田敏彦

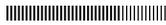
Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.54, No.1
January 2005



Japan Radioisotope Association

<http://www.jrias.or.jp/>

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)

VI. 加速器質量分析 (AMS) の薬物動態試験への応用研究[†]

池田敏彦

三共株式会社 薬剤動態研究所
140-8710 東京都品川区広町 1-2-58

Key Words : accelerator mass spectrometry, drug metabolism and pharmacokinetics,
microdosing, human study

1. はじめに

新しい医薬品を世に送り出すためには、動物を用いた前臨床試験とヒトでの臨床試験の二つの試験を実施して、安全性と有効性を確認しなければならない。どちらの試験に進行の遅れや問題があっても新薬創製の作業は完了しない。最近では、固相合成法を応用して極めて多種類の化合物を短時間に合成するコンビナトリアルケミストリーや得られた化合物群の薬理活性をロボットを用いて大量迅速スクリーニングするハイスループットスクリーニングなどの技術が導入され、前臨床試験段階でのスピードは格段に向上してきた。一方で、臨床試験の能率やスピードは、特に我が国においては新GCPが施行されて以来むしろ以前よりも落ちて来ているようにも見える。これに対して欧米では規制当局が臨床試験の効率化を図るべく色々な手段を講じており、例えば最近、欧州医薬品審査庁

(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) の医薬品委員会 (Committee for Proprietary Medicinal Products) が、限られた安全性試験を実施するのみで 100 μ g 以下の投与量でヒト試験を行っても良い (マイクロドージング試験)、という欧州の立場をまとめた報告書 (Position Paper といわれる) を提出している¹⁾。従来では 2 種類の動物種に静注投与と臨床投与経路で投与後、14 日間までの毒性学的観察を行い 2 時点 (2 日目と 14 日目) で病理学的及び組織学的観察を行うことになっていたものが、この場合、1 種類の動物種で良いとしている (動物種の選択にはインビトロの代謝試験でヒトに類似しているなど、妥当性を示す必要があるが)。このような低用量試験では薬物濃度測定がポイントとなり、ポジトロン断層撮影法 (Positron Emission Tomography, PET) や加速器質量分析 (Accelerator Mass Spectrometry, AMS) 及びその他の鋭敏な測定法が有効に使えるであろう、とされている。既に μ Ci オーダーの ¹⁴C 標識薬物を用いたヒト試験が欧米諸国では合法的にかつ安全に実施されている現状であるが、更に上記のような臨床試験が盛んに実施されるようになれば、我が国は新薬開発のグローバル競争にはるかに後れをとってしまうであろうことが危惧される。本稿では本邦における前臨床及び臨床試験の今後の展

[†] Instruments for Radiation Measurement in Life Sciences(4). VI. Use of Accelerator Mass Spectrometry in Studies on Drug Metabolism and Pharmacokinetics.

Toshihiko IKEDA : Drug Metabolism and Pharmacokinetics Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 1-2-58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan.

開に期待を込め、AMSの色々な利用法、特に薬物動態試験への応用例についてまとめた。なお、超高感度 ^{14}C 測定法としてのAMSの特徴については本誌AMSに関する連載を参照されたい²⁾⁻⁵⁾。

2. AMSの高感度薬物濃度分析法としての応用例

薬物動態試験において、血液・生体組織中の薬物濃度を測定することは、薬物に対する生体の曝露量を知る上で必須の作業である。このことにより投与量の妥当性を確認でき、副作用を避けるための適正使用が可能になるからである。最近では液体クロマトグラフとマススペクトロメータを組み合わせたLC/MSや、これに更にマススペクトロメータを繋いだLC/MS/MSによる測定法が高感度薬物濃度分析法として繁用され始めている。これらの方法はnmolオーダーの定量感度を有しており、通常の薬物濃度測定に十分対応できる方法となっている。一方、遺伝子工学の発展により極低濃度で生物活性を有するバイオテクノロジー医薬品も開発されるようになり、こうした医薬品の薬理的に有効な血中濃度を測定することはLC/MS/MS法などでは極めて困難であり、ラジオイムノアッセイや酵素イムノアッセイのような更に超高感度な分析法が測定に用いられている。ラジオイムノアッセイは、病院などでも極低濃度の血漿中ホルモン濃度測定などには汎用されているが、この方法は放射性の廃棄物を産することが短所になっており、最近では更に感度が高い蛍光法や発光法による非放射性免疫測定法がより好まれている。しかし、ShanらはAMSをラジオイムノアッセイに応用することにより、極微量の ^{14}C 標識体(1測定あたり1dpm以下)を用いて放射性廃棄物が排出されない高感度測定を達成できることを報告している⁶⁾。この報告によると米国で最も良く使用されている除草剤であるアトラジン及び代表的環境汚染物質ダイオキシンの測定ではそれぞれ $2.0 \times 10^{-10}\text{M}$ 及び

$2.0 \times 10^{-11}\text{M}$ の定量下限が得られ、これは従来のエンザイムイムノアッセイ法よりも1オーダー良い感度であった。

AMSとラジオイムノアッセイ組み合わせの別の応用例としてLuらは、がん疾患において高カルシウム血症の原因となる副甲状腺ホルモン関連蛋白(Parathyroid hormone-related protein, PTHrP)を測定する方法を報告している。彼らはPTHrPに対する ^{14}C 標識したモノクロナル抗体(PTHrPのアミノ末端側を認識する抗体)を調製し、この ^{14}C 標識抗体とカルボキシル末端側を認識する非標識の抗体と組み合わせてAMS測定する方法を考案し、エンザイムイムノアッセイよりも高感度でかつ放射性廃棄物が出ない二抗体ラジオイムノアッセイ法を開発することに成功した⁷⁾。一抗体を用いた拮抗法のラジオイムノアッセイは検量線がシグモイドになるのに対し、二抗体法では検量線が直線状に得られることも優れた特徴である。この方法では96穴プレートを利用しているが、1プレートあたり1.6nCiの ^{14}C を必要とするのみであり、廃棄できる基準(50nCi/g)よりもはるかに低い放射能レベルで十分な感度の測定が可能であった(10pmolから1.3nmolまで直線の検量線)。これらのAMSを用いたラジオイムノアッセイ法の有用性については本誌にも既に解説されている⁵⁾。このようにAMSとラジオイムノアッセイを組み合わせた測定法は、超高感度が要求され他に測定手段がない薬物の血漿中濃度測定などに使用可能であると考えられ、現時点では医薬品開発に応用された報告はないものの将来いろいろな応用例の報告が増えてくるものと推察される。

AMSによる高感度定量法は発がん性・変異原性物質のDNAや蛋白への結合量の測定にも応用されている(DNA付加体定量)。比較的最近までの方法では、蛍光法と ^{32}P ポストラベリング法がこの目的のために使われており、それぞれ 10^8 及び 10^{10} 塩基に一つの付加物を定量することができるが、AMSを用いた場合には

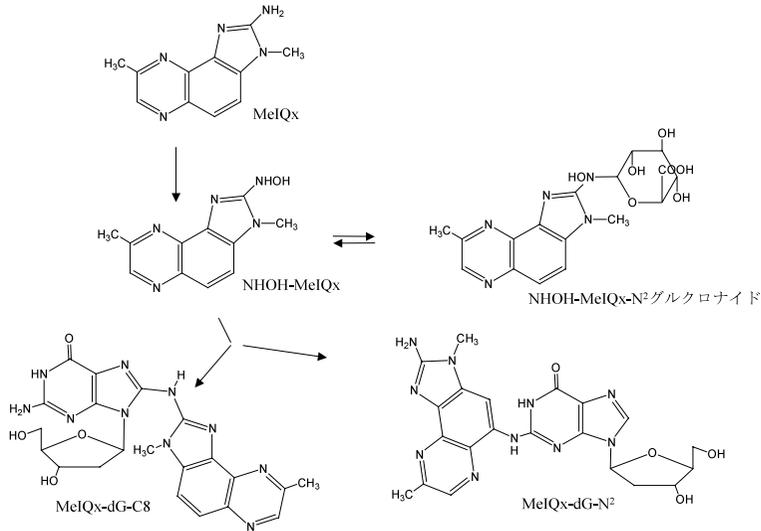


図1 MeIQx の DNA 塩基への共有結合 (文献9より引用)

10¹² 塩基に一つの付加物を定量できるぐらい格段に感度が上昇している⁸⁾。また AMS は以下に記述するごとく、ヒトに ¹⁴C 標識した発がん性物質を極低用量で投与し、安全に DNA 付加体を定量することができるようになったという点で画期的な方法である。

2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx, 図1) は肉を焼いた時に生ずる変異原性物質であり、高用量投与では動物で発がんが認められている。これは MeIQx が代謝によりヒドロキシルアミン型の代謝物 (NHOH-MeIQx) に変化し、続いてこれがエステル化を経たあと DNA のグアノシン部分に共有結合 (MeIQx-dG-C8 及び MeIQx-dG-N²) することによって由来するとされている (図1)。ヒドロキシルアミン型代謝物はグルクロン酸抱合により一旦解毒を受けるが (NHOH-MeIQx-N² グルクロナイド)、この代謝物は体循環によって大腸などの組織に移行して元の NHOH-MeIQx に戻り、遠位臓器でも発がん性を示すと考えられる。ヒトは食事をするにより極低用量の MeIQx に曝露されているが (一日に 2.6 ng/kg body weight の MeIQx を摂取していると見積もられ

ている)、そのリスクをこれまで評価することができなかった。Mauthe らは低用量の ¹⁴C 標識 MeIQx (304 ng/kg, 4.3 μCi/body) を手術を予定している大腸癌患者 5 名に経口投与し、術後摘出された大腸組織中の DNA 付加体を AMS により測定し、正常ラット及びマウスでの結果と比較している⁹⁾。この程度の放射エネルギーでは被験者の被曝量は年間被曝量の 0.05 ~ 0.1% であり、安全性の観点からは問題が無いとされた。摘出されたヒト正常及びがん組織中の DNA 付加体生成量はそれぞれ 25.6 及び 28.0 付加体/10¹² 塩基であり (正常組織とがん組織間に有意差無し)、ラット及びマウスではそれぞれ 20.6 及び 17.1 付加体/10¹² 塩基であったことから、同じ用量では実験動物よりもヒトにおける DNA 付加体濃度が有意に高く、ヒトにおける DNA 付加体濃度が有意に高く、ヒトは MeIQx による発がんに対して感受性が高いことが示唆された。Mauthe らは更に大腸組織から得た DNA 付加体を加水分解し、HPLC 分離して AMS 検出を行い、生成した DNA 付加体の同定を試みている (図2)。その結果、¹⁴C-MeIQx の投与を受けた患者からの DNA から MeIQx-dG-C8 及び MeIQx-dG-N² と一致する

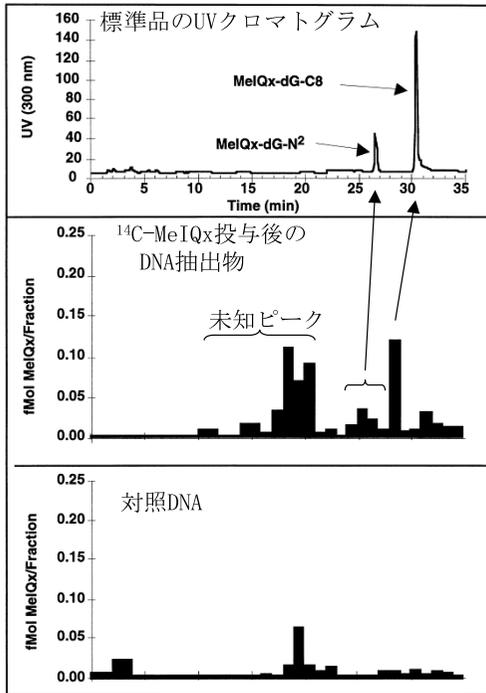


図2 ^{14}C -MeIQx 投与後のDNA付加体のクロマトグラム (文献9より引用)

ピークが認められ、これは投与を受けていない対照サンプルには検出されなかった。この試験は1999年の報告であり、マイクロドージングに関するPosition Paperが提出される前に実施されているが、日常的に経口摂取している発がん性物質についての、正にマイクロドージング試験そのものである。

3. AMSの薬物動態試験への応用例

GarnerはAMSを新薬の研究・開発に種々応用が可能であろうことを発表後¹⁰⁾、現実にAMSが定量法として動物実験に使えることを液体シンチレーションカウンタ法と比較して確認している¹¹⁾。その結果、血漿サンプルの放射能を測定した場合、AMS法と液体シンチレーションカウンタ法で測定値はほぼ一致し、相関係数は0.999であった。また、動物マスバランス試験の試料についてもほぼ同様な結果が得られることを実証した (AMSの場合は試料を希釈して定量)。このようにAMS法と液体シンチレーションカウンタ法による ^{14}C 放射能の測定値が良く相関することを確認した実験は本邦

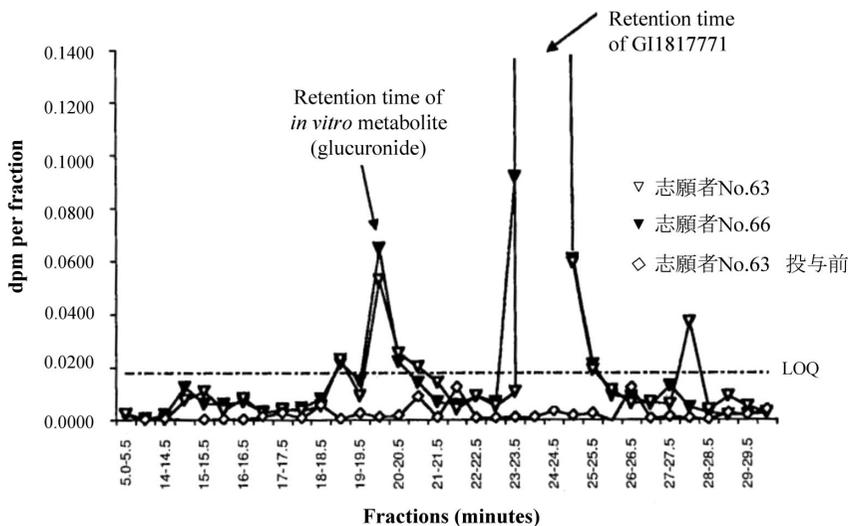


図3 HPLCによる ^{14}C -GI181771 投与後の糞中代謝物 (メタノール抽出) の測定 (文献12より引用)
LOQ: 定量限界 (Limit of Quantification)

の施設でも実施されており、本誌にも結果が解説されている³⁾。その後 Young らは、方法の可能性を探るための探索的な試験として、わずかに 121 Bq (7 260 dpm/body) の ^{14}C -GI1817771 (化学構造は不明) を男子健常人志願者 6 名に経口投与し、マスバランス試験及び血中放射能濃度の定量が実施可能であることを報告した¹²⁾。マスバランスの測定結果は投与後 120 時間までに投与量の $92.2 \pm 16.1\%$ が糞中排泄であり、尿中排泄量は 6.5% 以下であった。このような微量の放射能の回収試験 (マスバランス試験) が実施可能であることは驚くべきことである。また 2 名についてクロマトグラフィーの結果、糞中には大部分が未変化体として排泄されているもののわずかながら代謝物が存在するという情報も得られた (図 3)。この代謝物はインビトロ系で得られたグルクロン抱合体と一致しているため、GI1817771 がヒトでもグルクロン抱合を受けることが確認された。英国においてヒトへ放射能を投与する際、 $1 \mu\text{Sv}$ 以下の被曝量を与える量の場合では、当局 (Administration of Radiolabelled Substance Advisory Committee, ARSAC) の規制対象外となる。上記の投与量ではわずかに $0.06 \mu\text{Sv}$ にしか過ぎなかった。

Garner らも ^{14}C -R115777 (図 4) を健常人に

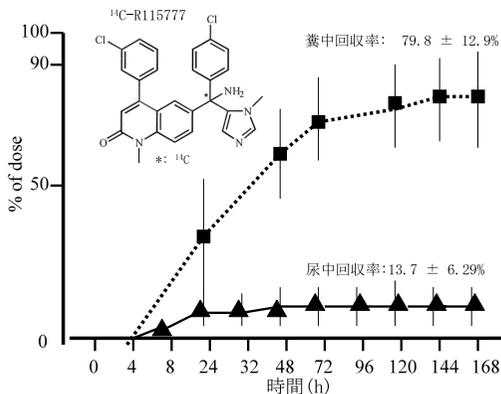


図 4 ^{14}C -R115777 を健常人に経口投与後の尿糞中放射能排泄率 (文献 13 より引用)

経口投与し (76 257 (34.35 nCi) dpm/body), 2 ~ 3 時間後の t_{max} に C_{max} 1.6 ~ 2.91 dpm/mL の値が得られ、また尿中に 13.7% 及び糞中に 79.8% の放射能が回収されたことを報告している (総放射能回収率: 93.5%, 図 4)¹³⁾。前述した Young らの試験と比べて約 10 倍の放射能を使用したこの試験においても被曝量は $1 \mu\text{Sv}$ 以下であると計算された。更に尿、糞及び血液試料 (全て 5 dpm 以下を注入) を HPLC 分析し、未変化体と代謝物の検出が可能であった (図 5 に糞のメタノール抽出物のクロマトグラムを示す)。

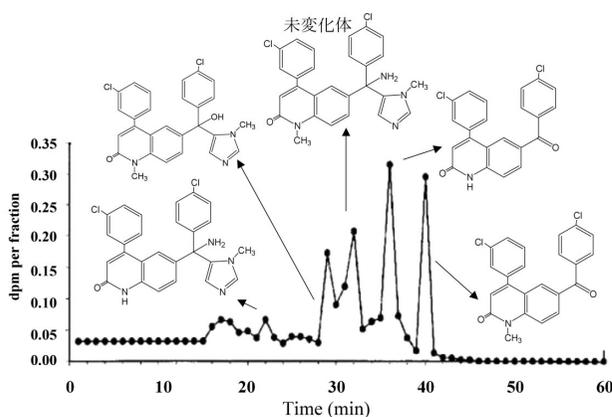


図 5 ^{14}C -R115777 を健常人に経口投与後の糞中代謝物 (メタノール抽出物) (文献 13 より引用) HPLC 注入量: 5 dpm

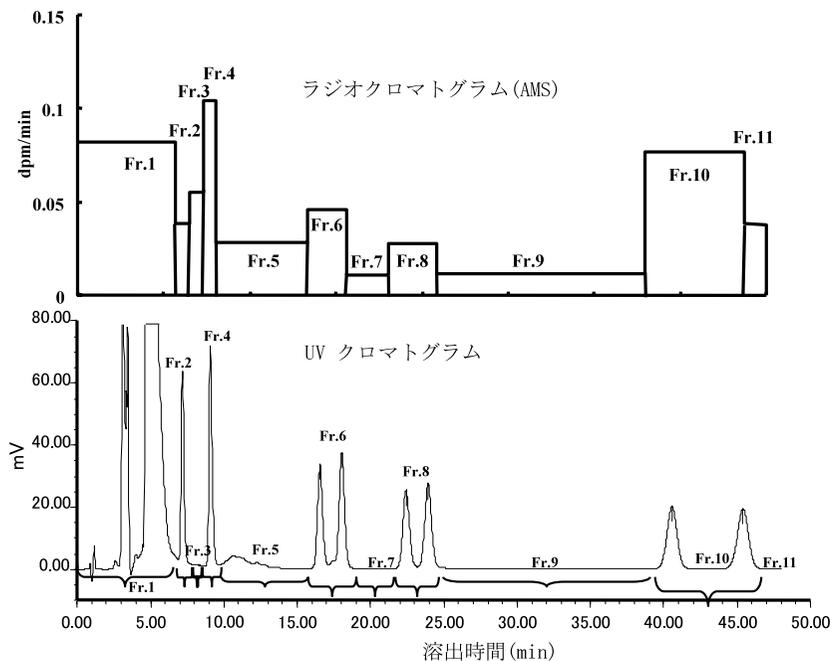


図6 ^{14}C -化合物 A の血小板中代謝物のクロマトグラム
HPLC 注入量：25 dpm

図6には筆者らの実験例を示す。抗血小板薬である化合物 A の ^{14}C 標識体をラットに経口投与後、血小板を回収して代謝物を抽出した。これに代謝物の標準品を添加し、25 dpm 相当分を HPLC により分離し UV 吸収を指標に合計 11 の分画を集めて AMS 分析に供した。この化合物は 2 種の立体異性体の混合物であるため、相似な形をしたピークがほぼ同量ずつ認められているが、10 番目の分画に来る未変化体に相当する部分に最も放射能が高いことが示された。また 4、6 及び 8 番目にも放射能が認められ、これらの代謝物は薬理活性を有する可能性があることが示唆された。ラットから得られる血小板の量は少なく、その中に含まれる代謝物を定量することは非常に困難であったが、AMS を用いることによりそれが可能となった一例である。

4. おわりに

液体シンチレーションカウンタでは測定でき

ないような低濃度の放射能の測定に AMS が応用可能であることが確認された。したがって、AMS を応用すれば ^{14}C 標識薬物を用いたヒト試験を、従来の少なくとも 1/1 000 の量の放射能で実施でき、被曝による影響を無視できることが明らかになった (μCi から nCi へ)。従来欧米で行われてきた、ヒトに μCi オーダーの ^{14}C 標識薬物を投与する薬物動態試験は、ほぼ開発が決定的となった薬物について実施されてきたものである。これは当該薬物の詳細な特性解析 (characterization) が目的であって、多くの化合物をスクリーニングして絞込みを行う考え方ではない。欧州で実施が認められたマイクロドージング試験は、明らかにいくつかの化合物から一番良い特性を有する薬物をスクリーニングして絞込みをすることを意図している。スクリーニングは本来の性質として数多く行うものであることから、今後 AMS がこれらの試験に積極的に応用されるようになるであろうと予想される。現時点で AMS 測定 of 1 試料あた

りのコストは決して低くはないが、繁用されるうちに低価格化していくものと推測され、更に頻繁に使用されるようになるであろう。

文 献

- 1) The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Position paper on non-clinical safety studies to support clinical trials with a single microdose, June 2002 (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/259902en.pdf>)
- 2) 中村俊夫, 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) I. 加速器質量分析(AMS)による環境中およびトレーサ放射性同位体の高感度測定, *RADIOISOTOPES*, **52**, 145-171 (2003)
- 3) 野口英世, 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¹⁴C標識薬物のヒトでのマスバランス試験, *RADIOISOTOPES*, **52**, 195-202 (2003)
- 4) 長塚伸一郎, 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¹⁴Cの定量, *RADIOISOTOPES*, **52**, 262-268 (2003)
- 5) 宮下正弘, 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) IV. 加速器質量分析(AMS)のトレーサ研究での利用—生化学分野における応用例, *RADIOISOTOPES*, **52**, 308-314 (2003)
- 6) Shan, G., Huang, W., Gee, S. J., Buchholz, B. A., Vogel, J. S. and Hammock, B. D., Isotope-labeled immunoassays without radiation waste, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 2445-2449 (2000)
- 7) Lu, C.M., Burton, W. D., Fitzgerald, R. L., Deftos, L. J., Buchholz, B. A., Vogel, J. S. and Herold, D. A., Mass spectrometric immunoassay for parathyroid hormone-related protein, *Anal. Chem.*, **74**, 5507-5512 (2002)
- 8) Garner, R. C., The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis, *Mutat. Res.*, **402**, 67-75 (1998)
- 9) Mauthe, R. J., Dingley, K. H., Leveson, S. H., Freeman, S. P. H. T., Turesky, R. J., Garner, R. C. and Turteltaub, K. W., Comparison of DNA-adduct and tissue-available dose levels of MeIQx in human and rodent colon following administration of a very low dose, *Int. J. Cancer*, **80**, 539-545 (1999)
- 10) 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)
- 11) 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 mass spectrometry and liquid scintillation counting for analysis of ¹⁴C-labelled drugs in plasma, urine and faecal extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 197-209 (2000)
- 12) 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)
- 13) Garner, R. C., Goris, I., Laenen, A. A. E., Vanhoutte, E., Meuldermans, W., Gregory, S., Garner, J. V., Leong, D., Whattam, M., Calam, A. and Snel, C. A. W., Evaluation of accelerator mass spectrometry in a human mass balance and pharmacokinetic study—experience with ¹⁴C-labeled (R)-6-[amino(4-chlorophenyl)(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-4-(3-chlorophenyl)-1-methyl-2(1H)-quinolinone (R115777), a farnesyl transferase inhibitor, *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 823-830 (2002)