

原 著

低バックグラウンド液体シンチレーション  
計数法の薬学への応用  
第2報 尿中内因性<sup>14</sup>Cの変動

堀江正信, 柳 真志帆, 馬場茂雄, 加藤結花, 吉村共之

Reprinted from  
RADIOISOTOPES, Vol.59, No.10  
October 2010



Japan Radioisotope Association

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

## 原 著

低バックグラウンド液体シンチレーション計数法の薬学への応用  
第2報 尿中内因性<sup>14</sup>Cの変動

堀江正信, 柳 真志帆, 馬場茂雄, 加藤結花\*, 吉村共之\*

東京薬科大学薬学部

192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1

\*アロカ株式会社 計測システム技術部 バイオシステム課

198-0023 東京都青梅市今井 3-4-22

2010年5月13日 受理

<sup>14</sup>C 標識薬物をトレーサとし, 低バックグラウンド液体シンチレーション計数法を検出法として用いる, ヒトにおける薬物動態試験では, <sup>14</sup>C 投与量 (Bq/kg) が動物実験の場合に比べて著しく低いので, バックグラウンド値 (BG) の変動が精度により大きな影響を及ぼす。本報では, 尿 5 mL を試料とし, 20 mL パイアルを用いて, ヒトにおける尿中 <sup>14</sup>C 放射能の日内変動, 日間変動, 個人差及び計数効率の変動などを研究した。尿中には <sup>14</sup>C に比較して約 30 倍量の <sup>40</sup>K の放射能が存在するので, <sup>14</sup>C の最適ウィンドウで計数することによって <sup>40</sup>K の影響をできるだけ小さくすることが肝要である。計数効率の変動は内部標準添加法によって校正できる。尿中内因性 <sup>14</sup>C 濃度におけるこれらの変動は比較的小さいので, 服用前日の同じ時間帯で採取した試料を BG として処理することによって十分に高い精度が得られることを明らかにした。

Key Words : low background liquid scintillation counter, microdosing,  
endogenous carbon-14 in human urine, pharmacokinetics

## 1. 序 論

薬物の安全性と有効性を確かめるには, <sup>14</sup>C 標識体をトレーサとして薬物の体内吸収 (absorption), 分布 (distribution), 代謝 (metabolism) 及び排泄 (excretion) (これらをまとめて ADME) を解明することが重要な課題である。最近, 我が国では長年に渡りタブー視されてきた, ヒトにおける <sup>14</sup>C 標識薬物投与実験 (Hot ADME) への関心が高まっている<sup>1)</sup>。Hot ADME に採用できる可能性のある放射能検出法として, 低バックグラウンド液体シンチレーション計数法 (装置を含めて, Low BG LSC), ラジオルミノグラフィ (RLG)<sup>2)</sup> 及び加速器質量分析法 (AMS)<sup>3), 4)</sup> などが挙げられる。

著者らは, Low BG LSC では, 1) 試料サイズを圧倒的に大きくできるので単位試料量あた

りで比較すると AMS や RLG より高感度である, 2) 測定系におけるメモリー効果を考慮する必要が全くない, 3) 測定装置, 測定単価がともに桁違いに安価である, などの理由から, Hot ADME における放射能測定には Low BG LSC が最も適していることを指摘し, ヒト尿 5 mL を試料とし, 標準サイズ (20 mL) のパイアルを用いた場合の測定精度は AMS より優れていることを報告した<sup>5)</sup>。次報で明らかにするように, 尿中には内因性放射性核種として <sup>40</sup>K の放射能が <sup>14</sup>C に比較して約 30 倍量存在する<sup>6)</sup>。したがって, Hot ADME の試料では <sup>40</sup>K の影響をできるだけ避けるために <sup>14</sup>C を最適ウィンドウで計数することが肝要である。

放射能を表す壊変率 (disintegration per minute, dpm) は, 普通, 試料の計数率 (counts per minute, cpm), 計数効率 (Eff), 自然計

数 (BG) から (1) 式で算出されている。以下、毎分の壊変数を dpm, 毎分の計数率を cpm と表す。

$$\text{dpm} = (\text{cpm} - \text{BG}) / \text{Eff} \quad (1)$$

この式で、BG は放射性同位体無添加試料の cpm である。Eff は既知量の放射性同位体を添加した試料の cpm から求められている。AMS, RLG でも本質的にはこれと同様の式が用いられる。(1) 式では、一連の計数試料は同じ BG で、同じ Eff で計数されていることを前提にしている。当然のことながら、Eff が異なる場合には正しく校正されなければならない。

試料ごとの Eff を、より精確に評価する方法として内部標準添加法を提案する。その骨子は、試料を 2 系列作成し、一方の系列には比放射能の高い 1 Bq の  $^{14}\text{C}$  (内部標準) を添加し、2 系列を計数し、内部標準を添加した系列の cpm の増加値から試料ごとの Eff を評価する方法である。内部標準を添加することに伴うクエンチングの変動による誤差は無視して差し支えない。また、自動分注器を使用すれば 2 系列作成に伴う作業量の増加も問題にならない。したがって、Low BG LSC では、Eff の変動の問題は根本的に解決されることになる。容易に内部標準添加法を適用できることが、Low BG LSC の大きなメリットである。

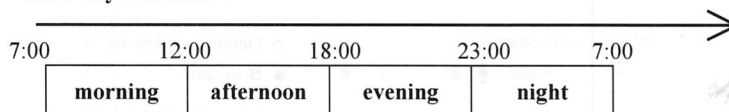
実験動物における ADME 実験では一般に投与放射能 (Bq/kg) が高い。したがって、試料サイズが小さく、cpm も高いので、BG やクエンチングの変動などに格別な注意を払うことなく放射能計測されている。これに対して、Hot ADME では、投与放射能を可能な限り低くすることが求められるので試料サイズを大きくしなければならない。その結果、cpm の低い、しかも強度にクエンチングを受けた試料を扱わなければならない。更には内因性  $^{14}\text{C}$  並びに  $^{40}\text{K}$  の影響も無視できなくなる。このような事情から、本格的な Hot ADME の研究に先立って、BG の変動について検討を行い、できる

だけ合理的に BG を設定する方法を確立しておくことが最も重要な研究課題である。本報では、BG の変動要因として日内変動、日間変動、個人差及び検量線の変動などを検討した。

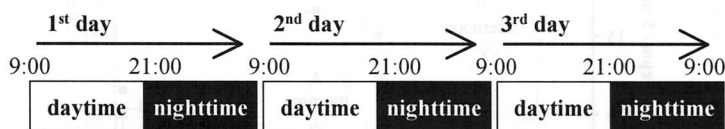
普通、 $^{14}\text{C}$  は、下限選別レベルを数 keV, 上限選別レベルを  $^{14}\text{C}$  の最大エネルギーに設定した、いわゆる B ウィンドウで計数されている。クエンチングを受けた試料では、その程度に応じて波高スペクトルは低波高側にシフトし、Eff は低下する。この場合、Eff は波高分布曲線、下限及び上限選別レベルで囲まれた面積に相当する。両波高選別レベルの幅を広げれば Eff は高くなるが、BG (主として  $^{40}\text{K}$  による) も高くなる。そこで、Hot ADME で扱う試料の計数では、Eff/BG が最大になるようなウィンドウ (最適ウィンドウ optimal window) に設定することが極めて重要なポイントである。LSC では、各試料のクエンチングの強度を示す目安として外部標準チャンネル比 (ESCR) が使われている。ESCR は、計数試料に  $\gamma$  線を照射し、コンプトン散乱で生じる二次電子のスペクトルの形状を測定することによって求められる。この指標値は、測定試料の種類や測定条件によって変動するが、同じ種類の試料を同じ条件で計数した場合には、この値が小さいほどクエンチングを強く受けていることを示す。したがって、ESCR を指標にしてグルーピングし、グループごとに最適ウィンドウで計数することもできる。

一般に、単位試料量あたりの感度は試料サイズに比例して向上する。Low BG LSC では、試料サイズによって三つの選択肢がある。第一は、試料を燃焼し、生成した二酸化炭素をベンゼンに変換して測る方法<sup>7)</sup>である。この方法では生成したベンゼン自身がシンチレータ溶媒になるので一日の排泄物の数分の 1 を測定できる。この方法は、我が国では、例えばヨモギなどをマーカー植物として原子力施設周辺の  $^{14}\text{C}$  環境汚染のモニタ法として使われている。 $^{14}\text{C}$  標識薬物を服用し、ヒトにおける薬物動態を明らかにするマイクロドージング臨床試験<sup>8)</sup>においても

## 1. Intra-day variation



## 2. Inter-day variation



## 3. Individual variation

5 volunteers

9:00 21:00

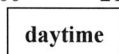


Fig. 1 Sampling time schedule for the variation studies.

この方法は究極のマスバランス試験になりうる。第二は、今回使用した Low BG LSC は大型バイアル (内容積 145 mL) 用に設計されており、大型バイアルを使うことである。大型バイアルを使えば 30 mL の尿を測ることができる。第三は、アタッチメントをつけて標準サイズバイアル (内容積 20 mL) を使うことである。この選択肢のメリットとして、標準サイズバイアルでも 5 mL の尿が測定でき、十分な感度が得られること<sup>5)</sup>、測定過程で汎用型 LSC と互換性があることなどである。このような理由から、本報では標準サイズのバイアルを用いて行った。

## 2. 実験の部

測定装置 Low BG LSC としてはアロカ株式会社 (LSC-LB5B (チャンネル数: 4 000 ch)) を使用した。

計数法は第 1 報<sup>5)</sup>に準じた。要点のみを記載する。

標準的な試料調製法と計数処理法 5 mL の尿を 20 mL ポリエチレンバイアル (PerkinElmer 社) に 5 個ずつとり、エコシンチウルトラ (National Diagnostics 社) 15 mL を混合した。そのうちの 1 個には 1 Bq の <sup>14</sup>C を添加した。装置自身の計数 (machine noise) を調べるために 5 mL の水及び尿の ESCR と同じ程度になる

ように 5 mL の水に 40  $\mu$ g のメチルオレンジを添加した試料 (mock urine) を同様に調製した。一昼夜以上装置内に放置した後、100 分間 (10 分間  $\times$  10 回) 計数した。1 Bq <sup>14</sup>C を添加した試料の計数から各グループの Eff を求め、最適ウインドウを設定した。最適ウインドウの cpm と Eff から各試料の BG (<sup>14</sup>C の dpm として) を求めた。日内変動及び個人差を検討する実験では B ウインドウでも計数した。

5 名の成人男子がボランティアとして参加し、Fig. 1 に示したタイムスケジュールに従って採尿を行った。

## 3. 実験結果と討論

まず、測定装置自身に起因する BG について検討した。尿試料の BG (以下、内因性 <sup>14</sup>C-BG) は尿中内因性放射性核種と装置自身のノイズからなる。この場合、後者は水を含んだ試料を対象として論じられがちである。第 1 報で報告したように、尿中に存在する <sup>14</sup>C の波高スペクトルは、クエンチングの影響を受けて著しく低波高側にシフトする<sup>5)</sup>。したがって、より高波高側の BG スペクトルが低波高側に移動してくるので、尿で設定した最適ウインドウを水試料に適用するのは大きな誤りとなる可能性がある。対象試料としては、尿とクエンチングレベルを

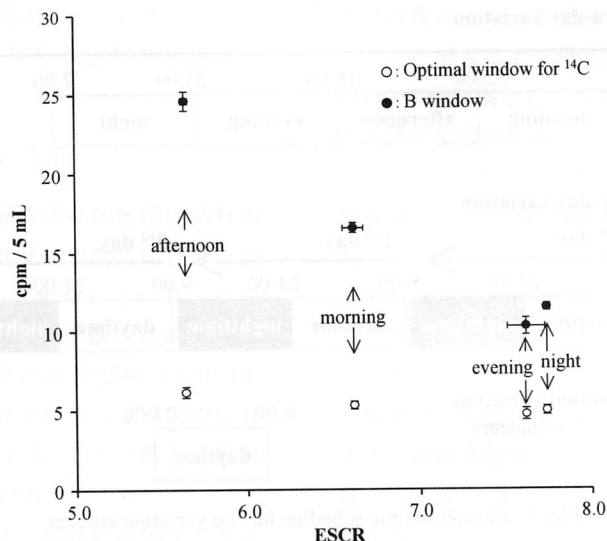


Fig. 2 Intra-day variation of endogenous <sup>14</sup>C count and ESCR (5 mL of volunteer A,  $n = 4$ ).

できるだけ同じにした水(疑似尿, mock urine)を使うのがより合理的と考えた。そこで、メチルオレンジをクエンチャーとして mock urine を調製した。

計数試料は、Fig. 1 に示したタイムスケジュールに従って採取した尿を使用して調製した。

まず、ボランティア A の尿を用いて日内変動を検討した。計数は、<sup>14</sup>C の最適ウインドウ及び B ウインドウで行った。実験結果を Fig. 2 にまとめた。なお、ESCR 値は両ウインドウの計数値に共通であるので、その標準偏差 (SD) は B ウインドウで求められた計数にのみ付した。また、午後尿、夕方尿、夜間尿の値は、午前尿について求めた最適ウインドウを使用して計算した。

Fig. 2 は、最適ウインドウで計数することの重要性を明確に示している。一般に、<sup>14</sup>C は B ウインドウで計数されている。この場合、<sup>14</sup>C 最適ウインドウで計数して得られた cpm は、B ウインドウで計数して得られた値よりもいずれも著しく低く、しかもその SD も際立って小さい。4 つの時間帯 ( $n = 4$ ) で得られた内因性 <sup>14</sup>C-BG の cpm の SD は、この図では示せない

ほど小さいので、cpm  $\pm$  SD / 5 mL (night urine, morning urine, afternoon urine, evening urine の順) の値を挙げておく。それぞれの値は  $4.93 \pm 0.23$ ,  $5.32 \pm 0.20$ ,  $6.15 \pm 0.31$ ,  $4.39 \pm 0.26$  である。B ウインドウで得られた計数と ESCR 値の間には明確な直線関係が成立している。最適ウインドウで得られた計数でも、同様な傾向が認められるが、両者の関係は B ウインドウの場合ほど明確ではない。この実験結果は、尿試料は強度のカラークエンチングを受けており、B ウインドウでは <sup>40</sup>K の信号が多く計数されていること、尿中内因性 <sup>14</sup>C の日内変動は、尿中内因性 <sup>40</sup>K の日内変動ほど顕著でないことを示唆している。

次に、同一時間帯で採った尿を用いて個人差を検討した。Hot ADME では計数試料を採取する時間間隔が問題である。著者らは、糞便は 1 日ごとに、尿は 12 時間ごとにまとめて計数試料とするのが最も合理的であると考えた。そこで、9 ~ 21 時に排泄された尿を昼間尿、21 ~ (翌日) 9 時に排泄された尿を夜間尿とした。5 人のボランティア (A ~ E, A のみ  $n = 4$ ) の昼間尿を試料として用いて内因性 <sup>14</sup>C-BG の

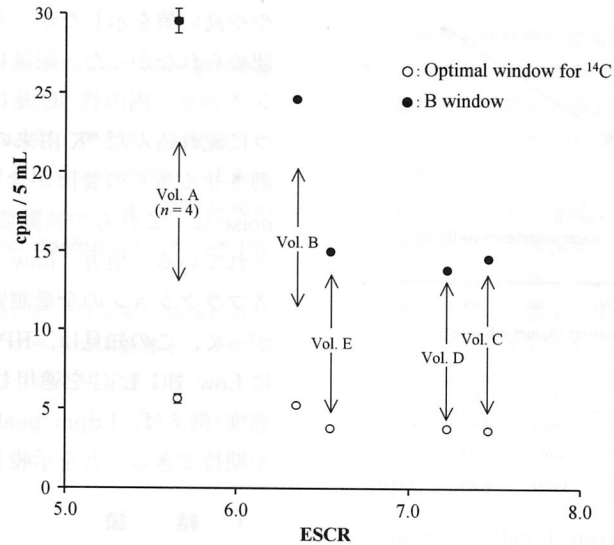


Fig. 3 Individual variation of endogenous <sup>14</sup>C count and ESCR (5 mL of daytime urine).

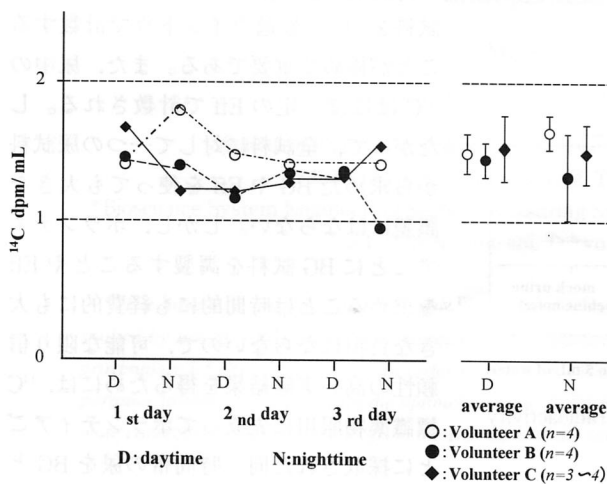


Fig. 4 Inter-day variation of endogenous <sup>14</sup>C radioactivity.

個人差を検討した。計数は <sup>14</sup>C の最適ウインドウ及びBウインドウで行った。実験結果を Fig. 3 にまとめた。

個人差を検討した実験においても、計数と ESCR 値の間には、日内変動で見られたのと同じような関係が認められた。Bウインドウで得られた cpm にはより大きな個人差が存在し、しかもその値は ESCR と良い直線関係にある。これに対して、最適ウインドウで計数して得ら

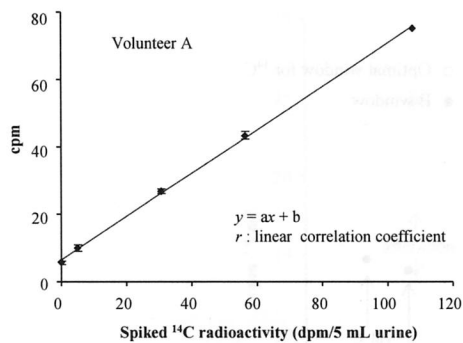
れた内因性 <sup>14</sup>C-BG は、ESCR 値が大きくなるにつれて低くなる傾向が認められたが、大きな個人差は認められなかった。

3人のボランティアについて、Fig. 1 に示したスケジュールに従って日間変動を検討し、実験結果を Fig. 4 に示した。図から明らかなように、いずれのボランティアにおいても、<sup>14</sup>C dpm/mL で表示された内因性 <sup>14</sup>C-BG に大きな日間変動は認められなかった。また、ボランティア間でも同値に大きな個人差は見られなかった。このことは、Hot ADME 実験で 100 kBq 程度の <sup>14</sup>C 標識薬物を服用し、

吸収率が数十%を示す薬物の尿中排泄率を求める場合、生物学的半減期の数倍に渡って追跡可能であることを示唆している。

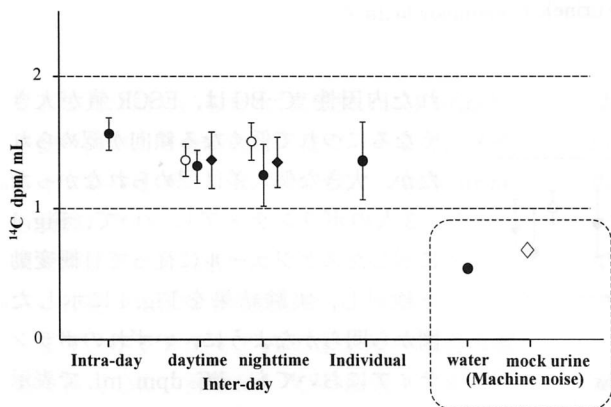
5人のボランティアの昼間尿を使って検量線における個人差を検討した。検量線の一例としてボランティア A で得られた結果を Fig. 5 に示した。この検量線において、a は Eff, b は BG 計数に相当する。a, b に小さな個人差が認められるが、相関係数はいずれも極めて高い。

Fig. 6 には、<sup>14</sup>C dpm/mL で表示された、ヒ



Vol.	A	B	C	D	E
a	0.642	0.659	0.669	0.633	0.665
b	6.49	5.58	4.02	5.28	4.17
r	1.000	1.000	1.000	0.996	1.000

Fig. 5 Linearity between  $^{14}\text{C}$  radioactivity and counting rate.



Mock urine was prepared by adding 40  $\mu\text{g}$  of methyloange to 5 mL of water.

Fig. 6 Three types of variation in endogenous  $^{14}\text{C}$  radioactivity of human urine (optimal window for  $^{14}\text{C}$ ).

ト尿中内因性  $^{14}\text{C}$ -BG における日内, 日間, 個人間の, 三つの変動の大きさを一括した。  $^{14}\text{C}$  を最適ウィンドウで計数した場合のこれらの変動はいずれも小さく, いずれも Hot ADME 研究の障害にはならないことがわかった。

Fig. 6 において 5 mL の水を試料として  $^{14}\text{C}$  の最適ウィンドウで読み取った計数 (machine noise,  $2.52 \pm 0.07$  cpm/5 mL) の変動が極めて小さいことは注目すべきことである。また, 尿とほぼ同じ ESCR を示すように調製した mock urine の計数は水のみを試料に比較して

やや高い値を示したが, それほど大きな違いは認められなかった。尿試料では, 尿によるクエンチング, 内因性  $^{14}\text{C}$  及び  $^{40}\text{K}$  の最適ウィンドウに流れ込んだ  $^{40}\text{K}$  由来の計数など, 計数を変動させる多くの要因が含まれている。machine noise は, これらの変動要因のない状態で計数されている。他方, Low BG LSC では HPLC 各フラクションの全量測定が可能である。したがって, この知見は, HPLC のオフライン計数に Low BG LSC を適用した場合に極めて高い感度 (例えば, 1 dpm/peak のピーク認識限界) が期待できることを示唆している。

#### 4. 結 論

尿中内因性  $^{14}\text{C}$  放射能濃度は比較的一定 (1.5 dpm/mL 前後) している。尿中内因性  $^{40}\text{K}$  の影響をできるだけ低減するためには, 試料を  $^{14}\text{C}$  の最適ウィンドウで計数することが極めて重要である。また, 尿中の  $^{14}\text{C}$  はほぼ一定の Eff で計数される。したがって, 全試料に対して一つの尿試料から求めた BG や Eff を使っても大きな誤差にはならない。しかし, ボランティアごとに BG 試料を調製することや Eff を求めることは時間的にも経費的にも大きな負担にならないので, 可能な限り信頼性の高い実験結果を得るためには,  $^{14}\text{C}$  標識薬物服用に先立ってボランティアごとに採取された同一時間帯の尿を BG とし, ボランティアごとに求めた Eff を使うことを勧める。

#### 文 献

- 1) 中島栄一, ヒトにおける放射性薬物動態 (hot ADME) 試験—日本における現状と将来, *RADIOISOTOPES*, 54, 337-345 (2005)
- 2) RLG 研究会: パリテーション検討分科会最終報告 (1998)
- 3) 長塚伸一郎, 加速器質量分析 (AMS) による生体試料中 BG 値の定量, *RADIOISOTOPES*, 52, 262-

- 268(2003)
- 4) 宮岡貞次, 加速器質量分析(AMS)の医薬品開発への応用, *RADIOISOTOPES*, **54**, 41-49(2005)
- 5) 馬場茂雄, 堀江正信, 柳 真志帆, 加藤結花, 吉村共之, 低バックグラウンド液体シンチレーション計数法の薬学への応用 第1報 尿中の極低レベル<sup>14</sup>Cの測定, *RADIOISOTOPES*, **58**, 169-178(2009)
- 6) 馬場茂雄, 堀江正信, 柳 真志帆, 加藤結花, 吉村共之, 低バックグラウンド液体シンチレーション計数法の薬学への応用 第3報 尿中内因性放射性核種の波高分析, 準備中。
- 7) 岩倉哲男, 櫻田義彦, 液体シンチレーション計数技術(IX)低放射能試料の測定—ローバックカウンタと試料調製法, *RADIOISOTOPES*, **24**, 668-678(1975)
- 8) 杉山雄一, 栗原千絵子, 馬屋原宏, 須原哲也, 池田敏彦, 伊藤勝彦, 矢野恒夫, 三浦慎一, 西村伸太郎, 大塚峯三, 小野俊介, 大野泰雄, マイクロドーズ臨床試験の実施基盤—指針作成への提言—, 臨床評価, **33**, 649-677(2006)

## Abstract

### Application of Low Background Liquid Scintillation Counting Method to Pharmacy : II. Variation of Endogenous <sup>14</sup>C in Human Urine

Masanobu HORIE, Mashiho YANAGI, Shigeo BABA,  
Yuka KATO\* and Tomoyuki YOSHIMURA\*

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences  
1432-1 Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392, Japan

\*Bioscience System Engineering Section, Measuring System Engineering Dept., ALOKA Co., Ltd.  
3-4-22 Imai, Ome-shi, Tokyo 198-0023, Japan

*The intra-day, inter-day and individual variations in endogenous <sup>14</sup>C radioactivity of human urine were studied by use of 5 mL urine. The endogenous <sup>14</sup>C radioactivity of human urine is relatively constant (approximately 1.5 dpm/mL urine). In order to eliminate the effect of endogenous <sup>40</sup>K it is of the greatest importance to count <sup>14</sup>C signal with the optimal window. Since these variations are relatively small, we can estimate correctly the net <sup>14</sup>C activity from the BG value of the same time zone of the day before dosing.*

(Received May 13, 2010)