実 験 技 術

医薬品開発における放射性薬剤の利用：
極微量 (microdose) 投与後の薬物動態の
AMS および PET による評価

上原 知也, 荒野 泰

要約：医薬品開発において、前臨床試験から臨床試験に進んだ候補薬剤の約 40% が脱落している。その多くは、前臨床試験における薬物の体内挙動が臨床のそれと大きく異なることに起因する。最近、欧州医薬品機構により極微量の薬物を用いる臨床試験に関する指針が提示されたのを受けて、本格的な第 I 相試験を行う前に、放射性核種で標識された極微量の候補薬剤をヒトに投与して、体内動態や代謝を追跡する予試験的な臨床試験が進められている。加速器分析法 (accelerator mass spectrometry: AMS) を用いるマスバランス試験や陽電子断層撮像法 (positron emission tomography: PET) を用いる画像解析によるヒトにおける予試験的な評価は、候補薬剤の開発期間の短縮や経済的負担の大幅な低減を可能としている。

1. はじめに

近年のヒトゲノム解読や分子生物学研究の進展から、新規医薬品の候補化合物数は大幅に増加した。しかし、新薬承認数に増加はみられていない。この大きな原因の一つとして、前臨床試験の結果が臨床試験で再現されないために開発中止に追い込まれた候補薬剤が多数存在することが挙げられる。とりわけ臨床試験に入った候補薬剤のおよそ 40% が第 I 相試験で脱落し、その主たる原因は薬物動態に問題があったとされている(1)。したがって、第 I 相試験に先立ち、候補薬物のヒトにおける体内動態を予試験的に調べて第 I 相試験へ進む候補薬剤を絞り込むことにより新薬開発効率が著しく向上する。

2003 年 1 月に欧州医薬品機構 (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) から、単回の極微量 (microdose) 臨床試験に必要な非臨床安全

性試験に関する方針が提示された。これによると、反復投与毒性試験の結果なしに拡大型単回投与毒性試験と遺伝毒性投与試験の結果をもってヒトにおける静脈投与試験が可能とされる。投与量は、臨床における推定用量の 1/100 あるいは 100 μg のうちの低用量とされている。これを契機に、薬理作用を発現しない極微量の候補薬剤を放射性核種で標識してヒトに投与し、AMS や PET を用いたマスバランス試験や体内動態の画像解析が予試験的な第一相試験として行われている。さらには、標的とする受容体に対する候補薬剤の占有率と服用量や服用回数の関係が、候補薬剤と同じ受容体を標的とする放射性薬剤を用いた画像解析から算出されている。AMS は、長半減期放射性核種である ^{14}C などの極低濃度における測定を可能とする装置であり、これまで主に海洋学、地球科学、考古学における年代推定に用いられてきた。また PET は、超小型サイクロトロンで産生される短半減期放射性核種である ^{11}C や ^{18}F などで標識された薬剤による癌をはじめとする疾病の画像診断や生体内機能素子の分子イメージングとして最近大きな注目が集められている。本稿では、AMS および PET を用いた医薬品開発について本邦での実施例を含めて紹介する。なお、本稿では、放射能の単位として適宜、Bq (ベクレル), dpm (decay per minute: 1 分間の壊変率), Ci (キュリー) を用いるが、 $1 \text{ Bq} = 60 \text{ dpm} = 0.027 \text{ nCi}$ の関係にある。

2. AMS を用いた ^{14}C 標識薬剤の体内動態試験

インビボ核医学診断では、数分から数日の半減期を有する放射性核種が利用されている。これに対して AMS を用いた薬物動態試験では、半減期 5730 年の β^-

キーワード：医薬品開発, 放射性薬剤, 体内動態, 加速器分析法, 陽電子断層撮像法

千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

e-mail: arano@p.chiba-u.ac.jp

原稿受領日：2005 年 5 月 10 日, 企画教育委員会依頼原稿

Title: Application of radiotracers for drug development

Author: Tomoya Uehara, Yasushi Arano

線放出核種である ^{14}C で標識した候補薬剤をヒトに投与して、ヒトにおける体内動態、すなわち服用した薬物の血中濃度の経時変化、尿分中への排泄速度、血中および尿分中の代謝物パターンが直接測定される。

2-1) 自然界における ^{14}C レベル

炭素には ^{10}C , ^{11}C , ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}C 等の同位体が存在する。このうち ^{12}C と ^{13}C は安定同位体であるが、自然界の ^{13}C は ^{12}C の約 1% 存在するため極微量の候補薬剤の動態評価のような総量を測定するトレーサ試験には不適切である。また、 ^{10}C と ^{11}C は、それぞれ半減期 19 秒および 20 分の β^+ 崩壊、 ^{15}C は半減期 2.3 秒の β^- 崩壊で減衰する短寿命の核種であるため被験者に投与して長時間にわたる代謝、排泄を測定するマスバランス試験に応用するのは困難である。したがって、候補薬剤の炭素を標識してヒトにおける体内動態を追跡するには、その半減期から ^{14}C が唯一の選択肢となる。

自然界における ^{14}C の多くは、大気中の ^{14}N と宇宙線からの熱中性子とが衝突する $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$ 反応により大気圏上層部で生成し、二酸化炭素 [^{14}C] CO_2 となる。大気中の [^{14}C] CO_2 は植物により同化され、またそれを他の生物が食べる食物連鎖により炭素プールを循環しながら半減期 5730 年で崩壊する。その結果、自然界の $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ の存在比は 1.2×10^{-12} で平衡状態になっている。天然に存在する ^{14}C の存在量は pMC(% modern carbon) で表現し、100 pMC = 13.56 dpm/g carbon と定義され、現在の炭素プールにおける ^{14}C の存在量は 116 pMC である。これは、体重 60 kg のヒトの体内には約 50 nCi の ^{14}C が存在し、1 日に摂取する食物には 1 nCi 程度の ^{14}C が含まれることを示す。なお、生物が死滅して炭素循環から外れると、[^{14}C] CO_2 の取り込みがなくなり、時間と共に ^{14}C が減衰する。これを測定することにより遺跡や遺物の存在時期が推定されている。

2-2) AMS の特徴

AMS では、試料から目的の放射性同位体 (^{14}C) とその安定同位体 (^{12}C , ^{13}C) をイオン源でイオン化し、加速器にて加速する。このとき、 ^{14}C と同じ質量を持つ $^{12}\text{CH}_2^-$ や $^{13}\text{CH}^-$ などの分子イオンは原子イオンに分解され、質量分析において ^{14}C の測定を妨害せずに ^{14}C が正確に選別できるようにする。次いで、検出器によりイオン量の多い ^{12}C イオンと ^{13}C イオンはファラデーカップルを用いてイオン電流を測定し、イオン量の少ない ^{14}C イオンは重イオン検出器で測定して $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ あるいは $^{14}\text{C}/^{13}\text{C}$ として算出される (2)。このように、AMS では ^{14}C の原子数 (正確には内部標準

に対する比) を直接測定する。これに対して、前臨床試験等で汎用されている液体シンチレーション計測器 (LSC) では ^{14}C 原子の壊変現象を測定する。

放射エネルギーを A, 半減期を T, 原子数を N とすると、

$$A = (0.693/T) \cdot N$$

であることから、半減期が 20 分の ^{11}C と 5730 年の ^{14}C では、同じ放射エネルギーを与える物質が大きく異なり、 ^{11}C と同じ放射エネルギーを与えるには ^{14}C では ^{11}C の (5730 年 / 20 分) 倍の物質が必要となる (^{14}C の比放射能は ^{11}C より遙かに低い)。比放射能の低い ^{14}C などの放射性核種では、全体量に比べて崩壊する割合は僅かであることから、割合として遙かに多い原子数 (N) を測定する AMS による測定は、LSC による放射線測定に比べて高い感度を有することになる。実際、実験方法によっても異なるが、LSC による放射線測定に比べて、AMS では、その数百から数千倍の測定感度を有する。これは、候補薬剤のヒトにおける体内動態を追跡する場合、AMS を用いることで LSC に比べて数百分〜数千分の一の放射エネルギーの ^{14}C 標識薬剤で達成されることを示し、被験者の内部被ばくの著しい低減につながる。

2-3) AMS を利用した薬物の体内動態試験

Young らは新しく開発した薬剤 GI181771 の生体内残留率を求めるために、122 Bq の ^{14}C 標識 GI181771 (2.7 mg) をヒトに投与し、尿、糞便への排泄量を検討した。そして、投与 5 日後に糞便中へ 92% の標識化合物が排泄されることを認めた。AMS による測定限界値は糞便 1 g 当たり 0.86 dpm, 尿 1 mL 当たり 0.2 dpm, 血清 1 mL 当たり 0.43 dpm であった。また試料から生体由来の炭素を取り除き ^{14}C のバックグラウンドを低減した場合、HPLC で分析した各フラクションでの検出感度は、糞便試料で 0.018 dpm, 血清試料で 0.0016 dpm と大きく向上した。本試験において被験者が受けた内部被ばく量は 0.06 μSv と算出されている (3)。平均的な一般人は 1 年間に自然界から約 2.4 mSv の放射線を浴びており、そのうちの 200 μSv は食事由来とされている。したがって、食事による 1 日の内部被ばく量は約 0.55 μSv と算出され、122 Bq の ^{14}C 標識 GI181771 の投与で受ける内部被ばく量は、ヒトが自然界から摂取する 1 日の ^{14}C による内部被ばく量の約 1/10 となる。

このように半減期の長い ^{14}C 標識薬剤の測定に AMS を利用することにより、問題となるような被ばく線量を受けることなく、ヒトにおける候補化合物の長期間にわたる血中動態や代謝物の検討、排泄経路についての情報を得ることが可能となった。医薬品開発

図1 $[^{11}C]$ ラクロプライドを用いたハロペリドールの D_2 受容体占有率の算出

におけるAMSの利用についての詳細はLappinらの総説を参考にされたい(4)。しかし、AMSの場合、試料中の全炭素を酸化還元反応により二酸化炭素、次いでグラファイトへ変換する時間と熟練を要する前処置が必要であることや大規模で高価な設備が必要であることなど、その実施には制約がある。最近の報告では、低バックグランド型のLSCを用いて多量の試料を長時間測定することによっても被験者に問題となる被ばく線量を与えることなく ^{14}C 標識薬剤によるマスバランス試験が可能とも報告されており、本邦における今後の動向が注目される。

3. PETを用いた薬剤開発

PETは陽電子(ポジトロン)を放出する放射性核種である ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O あるいは ^{18}F で標識した化合物を生体に投与し、その動態の経時変化を非侵襲的に画像として捉える核医学診断である。これらの超短半減期の放射性核種で標識された化合物は比放射能が高く、極微量の投与で高感度の検出が可能なことから、薬理作用を発現しない低用量における候補薬剤の体内動態の画像解析を可能とする。近年、臨床開発の初期段階でポジトロン核種で標識した候補化合物を用いたヒトにおける薬物体内動態が検討されている。また、画像診断の目的で現在臨床使用されているPET薬剤を利用して、候補薬剤の至適服用量や服用回数を求める試験も進められている。

3-1) 薬剤の体内動態の検討

Saleemらは抗ガン剤であるN-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide(DACA)を ^{11}C で標識した $[^{11}C]$ DACAを患者に投与し、その動態をPETにより測定した(5)。このときの投与量は第I相臨床試験に使用される1000分の1量を用いている。血液サ

ンプルのHPLC分析から、 $[^{11}C]$ DACAは投与後速やかに代謝され、投与後期の標識化合物の体内分布はDACA自身のそれとは異なることが推測された。 $[^{11}C]$ DACAは、投与初期に腫瘍への集積を示したが、心筋への集積も観察され、心血管系への副作用を示唆する。また、脳への集積は観察されず、第I相臨床試験で中枢神経症状が観察されなかった所見と一致した。これらの結果を踏まえ、著者らはDACAの安定性を高めた誘導体の開発へと方向転換した。このように薬剤開発の初期にPETを用いて薬剤の代謝や分布を測定することにより、第1相試験を回避することが可能となり、開発時間と経費の大幅な削減に結びついた。なお、ここで注意しなければならないのは、PETで観測しているのは放射線を放出する ^{11}C などの放射性核種の動きであり、必ずしも薬剤自身由来の放射線ではないことである。そのため、薬剤の生体内での代謝に注意を払いながら、その解析を行う必要がある。

3-2) 薬剤の投与量および投与回数の検討

これまで開発され核医学診断に使用されているPET薬剤は、新規薬剤の至適服用量や服用回数を決定することに利用されている。これは、評価薬剤と同じ標的分子に対して高い親和性と選択性で結合するPET薬剤を評価薬剤の服用前後に投与して、その結合率の変化を画像解析から求めることにより評価薬剤の占有率が算出される(図1)。Fardeらは、標識リガンドの遊離濃度[F]と標的分子との結合体[B]の比である[B]/[F]の変化から、占有率(%)を以下のように定義している(6)。

$$\text{占有率(\%)} = 100 \times ([B]/[F] \text{ 対照} - [B]/[F] \text{ 薬物負荷}) / ([B]/[F] \text{ 対照})$$

ここで、対照とは、候補薬物を投与する前の標識リガンドの、薬物負荷とは、候補薬物投与後の標識リガン

図2 $[^{11}\text{C}]$ MP4Aの脳内動態

ドの $([B]/[F])$ 値を示す。

たとえばハロペリドールなどの抗精神病薬では治療閾値と副作用閾値の間が狭く、副作用を発現することなく薬効を発揮する服用量や服用方法の決定には多くの時間が必要とされてきた。Kapur らは PET 薬剤である $[^{11}\text{C}]$ raclopride を用いてハロペリドールを 1.0 mg/日あるいは 2.5 mg/日を 2 週間投与した患者を対象に、線条体におけるドパミン D_2 受容体占有率と薬理効果および副作用発現の関係を検討した(7)。そして、ドパミン D_2 受容体の 65-70% をハロペリドールが占有すると薬効が発揮されるが、占有率が 78% 以上になると錐体外路症状の発現が有意に増加することを認めた。このことはドパミン D_2 の占有率を 65-70% とする 1-3 mg/日がハロペリドールの至適な投与量であることを示す。

Risperidone は 1 日 4 mg の服用が推奨されている。Risperidone 3 mg を服用前後での $[^{11}\text{C}]$ raclopride のドパミン D_2 への集積から占有率を算出したところ 72% であり、これまでの臨床用量の妥当性を支持する結果を得た(8)。このように受容体の占有率を指標とすることにより、短期間で合理的な服用量の設定が可能となる。

3-3) 薬理作用の評価

Anderson らは、既存の PET 薬剤をバイオマーカーとして、薬理効果を発揮する薬剤の服用量および服用回数を検討した(9)。血管新生抑制剤である Combretastatin A4 phosphate(CA4P) を投与した場合の腫瘍お

よび正常組織における血流量と血液量を ^{15}O (半減期 2 分) で標識した H_2O および CO ガスを用いて測定した。CA4P 投与前後における PET による測定から、CA4P 投与 30 分後の腫瘍の血流量と血液量は用量依存的に減少し、52 mg/m^2 以上の投与量で、血流量は投与前の 49%、血液量は投与前の 15% 減少することを認めた。また、CA4P の投与 30 分後における脾臓の血流量と血液量はそれぞれ投与前に比べて 35%、18% と有意に減少し、腎臓においても投与前に比べて血流量と血液量共に 6% の減少を示した。52 mg/m^2 以上の CA4P を投与して 24 時間後では、腫瘍の血流量は回復傾向にあったが、投与前に比べて有意な減少を維持した。一方、正常組織では投与 24 時間後には投与前と比べて有意な相違は観察されず、腫瘍血管が正常組織の血管に比べ、CA4P による作用からの回復が遅いことを認めた。これらの知見より、第 II 相臨床試験における CA4P 服用量を 1 週間に 1 回以上 52-66 mg/m^2 と設定した。

アルツハイマー型認知症の治療薬である塩酸ドネペジルは脳 AChE 活性を阻害し、コリン神経での神経伝達効率を上げることで効果を発揮する。Irie らは、ヒト大脳皮質でのアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性測定 PET 薬剤、 $[^{11}\text{C}]$ N-methyl-4-piperidyl acetate (MP4A) を開発し、これを用いて塩酸ドネペジルの薬効を検証した。MP4A は、投与後速やかに脳内へ受動拡散で取り込まれた後、AChE により代謝を受けて脳内に蓄積するが、AChE による代謝を受けない薬剤は脳から速やかに排泄される (図 2)。脳内の AChE 活性を PET により定量的に測定するには、脳へ取り込まれた薬剤の脳からの消失速度 k_2 と AChE による代謝速度 k_3 とが適切な比を有する必要があるが、MP4A は k_2 と k_3 との比を最適化した化合物であり、本薬剤の投与で脳内へ集積する放射エネルギーは病態に直接関わる AChE 活性と強い相関を示す。実際、健常者での脳内 AChE 活性はインビトロでの測定値とよく一致し、大脳皮質では比較的低く、視床では中程度であること、アルツハイマー病患者では AChE 活性が低いことを認めた(10)。塩酸ドネペジルの服用前後に MP4A を用いて脳内 AChE 活性を測定したところ、これを服用した患者における脳内 AChE 活性が平均で 36% 低下することが確認された (図 3) (11)。

3-4) 標的部位における薬物動態の評価

これまで薬物の体内動態は主に血液中の薬物濃度の経時変化から評価されてきた。しかし、作用部位における薬物動態を直接測定できれば薬物の服用量や服用回数を正確に設定することが可能となる。受容体を標

図3 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ による脳内 AChE 活性の画像化

$[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ 投与後の (A) 健常者、(B) アルツハイマー病 (AD) 患者、(C) 5 mg/day のドネペジル投与後の AD 患者の脳内 AChE 活性の PET 画像。健常者に比べて AD 患者では、脳内 AChE 活性の低下が観られる。ドネペジルの服用で、本薬剤の薬理作用である AChE 活性の低下が観察される。上段と下段は脳の異なる部位における断層像を示す。

的とする薬剤では、その占有率の時間変化は薬理作用を反映する指標となる。Takano らは抗精神病薬である risperidone 服用後の血液中の濃度と PET 薬剤である $[^{11}\text{C}]\text{FLB457}$ を用いたドパミン D_2 受容体の占有率との関係を検討した(12)。その結果、risperidone を 4-6 mg/ 日を服用した患者の血液中での半減期が約 18 時間であったのに対して、PET で測定した側頭葉でのドパミン D_2 受容体からの半減期は 74 時間と大きく異なることを認めた。また、服用量と血液中での薬物濃度および受容体占有率との関係をもとに、血液中の動態から脳内の動態を評価できることを示した。こうした方法は、受容体やトランスポーターと薬剤との相互作用をインビボで実際に評価し、より信頼性のある客観的指標を与えることから、これまでの新薬開発過程で避けることが困難であった人的ならびに経済的な負担を大きく低減する。

4. おわりに

これまで、ヒトに ^{14}C 標識薬剤を投与する薬物試験は困難とされていた。しかし、AMS を用いることで、自然放射線による年間被ばく線量の変動範囲内の ^{14}C 標識薬剤を用いても十分に精度の高い動態試験が可能となった。第 I 相試験前に予試験的に本試験を行うことにより、候補薬剤のヒトにおける体内動態や代謝を知ることが可能となる。また、前臨床試験では検出さ

れないヒトに固有の代謝物の確認にも大きな威力を発揮する。ヒト固有の代謝物が存在する場合、その構造確認と毒性の評価を行うことで、第 I 相試験の安全性が大きく向上する。PET を用いたヒトにおける検討は、体内動態の評価のみならず、受容体占有率の測定や酵素阻害率の測定などの薬効評価に大きく貢献する。米国ではアプレピタント (サブスタンス P/ ニューロキニン 1 受容体遮断作用を有する鎮吐薬 (Merck 社)) の第 II 相臨床試験において、受容体占有率の PET データを米国食品医薬品局 (FDA) が採択した例もある。このように、極微量の標識薬剤を用いたヒトにおける予備的試験は、医薬品の開発速度を促進し、経費を軽減する新たな手法として、その利用がますます広がることが予測される。一方、溶解速度が律速となるような経口薬や First-Pass の代謝が飽和を受ける薬剤、組織移行にトランスポーターが関与する薬剤、さらにタンパク結合の高い薬物などの場合、極微量の候補薬剤の体内動態が臨床使用量に外挿できるのか疑問視されている。これに対して、極微量の標識候補薬剤を用いた試験を行った後、極微量の標識候補薬剤に臨床用量の候補薬剤を混和した試験が施行されている。一部の薬剤では極微量と臨床使用量との間に強い相関が認められているが、すべてに適応できるとは考え難く、今後の重要な検討課題である。Microdose 試験はヒトにおける代謝物を同定可能とすることから、ヒトと同じ代謝物を与える実験動物における投与量と体内動態の関係結果からヒトでの動態を予測する新たな数学モデルの構築も期待される(13-15)。

本稿ではふれなかったが、脳や心筋の血流量の測定、中枢や末梢に存在する受容体の臨床診断に認可薬剤として利用されているヨウ素 -123 (^{123}I)、テクネチウム -99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) などの γ 線放出核種で標識された放射性医薬品も、候補薬剤のインビボにおける薬効評価に利用可能である。 γ 線を利用した断層画像診断法 (single photon emission computed tomography: SPECT) では、高価な超小型サイクロトロンが不要であり、 ^{11}C や ^{18}F に比べて ^{123}I や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は長時間の半減期 (それぞれ 13 時間と 6 時間) を有することから、より長期にわたる体内動態の追跡が可能である。すでに認可医薬品として臨床に供されていることから、これらの薬剤の投与による安全性は担保されている。また、欧米の一部の製薬会社では、小動物を用いた前臨床段階における候補化合物の絞り込みに、小動物用の PET や SPECT を用いた候補薬剤の体内動態や標的分子との結合性等の測定なども進められている。

このように、標識薬剤は医薬品開発の様々な局面に

利用され、開発の効率化に大きく貢献している。本邦においても一部で PET による薬剤評価が行われているが、 ^{14}C 標識薬剤を含めた標識薬剤の医薬品開発への応用について、安全性と有効性さらには倫理上の問題を考慮したガイドラインの早期策定が望まれる。

文 献

- 1) Wilding I, et al. Good Clinical Practice J. 2004;11:2-4.
- 2) 中村俊. 地質学会誌. 1998;49:131-136.
- 3) Young G, et al. Xenobiotica. 2001;31:619-632.
- 4) Lappin G, et al. Anal Bioanal Chem. 2004;378:356-364.
- 5) Saleem A, et al. J Clin Oncol. 2001;19:1421-1429.
- 6) Farde L, et al. Arch Gen Psychiatry. 1992;49:538-544.
- 7) Kapur S, et al. Am J Psychiatry. 2000;157:514-520.
- 8) Yasuno F, et al. Psychopharmacology (Berl). 2001;154:112-114.
- 9) Anderson H L, et al. J Clin Oncol. 2003;21:2823-2830.
- 10) Iyo M, et al. Lancet. 1997;349:1805-1809.
- 11) Shinotoh H, et al. Neurology. 2001;56:408-410.
- 12) Takano A, et al. Int J Neuropsychopharmacol. 2004;7:19-26.
- 13) Bergsörm M, et al. Eur Clin Pharmacol. 2003;59:357-366.
- 14) Lappin G, et al. Nat Rev Drug Discov. 2003;2:233-240.
- 15) Garner RC. Drug Discov Today. 2005;10:449-451.