

報告番号	甲 第 12886 号
------	-------------

主論文の要旨

論文題目 中赤外キャビティリングダウン分光に基づく
生体試料中放射性炭素同位体分析法の開発
(Development of radiocarbon analysis for
biomedical applications based on mid infrared
cavity ring-down spectroscopy)

氏 名 寺林 稜平

論文内容の要旨

炭素の同位体の一つである ^{14}C は、半減期 5730 年の β 崩壊核種であり、考古学や地質学における放射性炭素年代測定その他、環境学・医学・農学など幅広い領域において利用されている。特に、安定同位体 (^{12}C 、 ^{13}C) と比較して、その存在比が小さい ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 10^{-12}$) ことを利用した ^{14}C トレーサーは、環境・生体中の様々な動態を高感度に評価できる有用なツールである。トレーサー応用に伴う ^{14}C 分析には、天然同位体比と同程度の試料を評価できるアバンダンス感度が必要とされ、従来は加速器質量分析法 (Accelerator Mass Spectrometry: AMS) が用いられてきた。AMS は天然存在比を大きく下回る試料に対しても、十分なアバンダンス感度を有するものの、分析スループットや分析コスト、アクセシビリティといった点でトレーサー応用には不向きである。一方で、 ^{14}C からの β 線を計数する液体シンチレーションカウンティング法 (Liquid Scintillation Counting: LSC) は、比較的高いスループットを有し、小型であるため、広く普及しているものの、 ^{14}C が長半減期核種であることから、感度が限られ、試料中に十分な放射エネルギーの ^{14}C が必要であるため、適用範囲が限定されている。このような背景から、 ^{14}C トレーサー応用における広範な分析ニーズを充足するために、より迅速簡便で高感度な ^{14}C 分析法が求められている。

本研究では、AMS や LSC に代わる新たな ^{14}C 分析手法として、高感度レーザー吸収分光であるキャビティリングダウン分光法 (Cavity Ring-Down

Spectroscopy: CRDS) と ^{14}C を含む二酸化炭素の中赤外域基本音吸収を組み合わせた手法の開発を行い、分析システムを構築し、高感度化を目的としてバックグラウンド抑制法・レーザー発振周波数安定化法を開発した。これらにより、より簡便なシステムで生体・環境中トレーサー応用に求められる性能を実現し、複数領域のトレーサー応用実証を行うことで、その有用性を明らかとした。

本論文は全6章から構成され、以下に各章ごとの要約を示す。

第1章 序論

本章では、主に本研究の背景について述べる。 ^{14}C の利用とその分析ニーズ、既存の ^{14}C 分析手法として、放射線計測・質量分析・レーザー分光に基づく各手法について概説し、特に CRDS について、定量分析の原理と様々な応用例を説明する。最後に、本研究の目的として、CRDS に基づく ^{14}C 分析法の開発と ^{14}C トレーサー分析への適用を挙げ、本論文の構成を述べる。

第2章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析システムの開発

本章では、中赤外半導体レーザーを用いた CRDS に基づく ^{14}C 分析法 (^{14}C -CRDS) について説明し、その分析システムの開発について述べる。

^{14}C トレーサー応用において想定される分析試料から、アバundance感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 1.4 \times 10^{-11}$ ・検出限界 0.017 Bq/sample (= 1 dpm/sample) 以下・測定精度数%・前処理が必要ないこと・測定時間 15 分以内/1 測定を ^{14}C -CRDS 分析システムの性能目標とした。Fig. 1(a)に ^{14}C -CRDS による ^{14}C 分析法の手順、および Fig. 1(b)に構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの概要を示す。分析システムは、試料導入部の他、中赤外半導体レーザー光源・光学系、高反射率光共振器とガスセル、検出器・信号処理系から構成される。分析試料は試料導入部の燃焼管にて燃焼酸化(炭酸ガス化)される。試料由来 CO_2 ガスと夾雑ガスは、加熱吸脱着カラムに一旦吸着された後、分離されて放出される。 CO_2 ガスは CRDS 分析セルに到達したタイミングで閉じ込められ、分析セル中の光共振器に入射された中赤外レーザーに

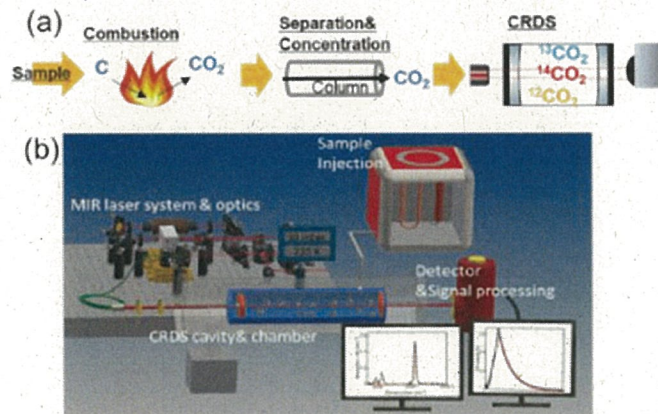


Fig. 1 ^{14}C -CRDS 分析の概要
(a) 分析手順 (b) 分析システム

より CRDS 測定がなされる。得られた ^{14}C CO_2 吸収スペクトルから ^{14}C が定量される。

分析セルに封じ切られた CO_2 に対し、CRDS 測定により $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトルを取得・評価するために、FPGA を用いたレーザー電流、および光スイッチの制御系を開発した。さらに、高分解能ディジタイザにより取得した光検出器からの減衰信号に対して、オンラインで指数関数フィッティングを行い、減衰率を評価するシステムを開発した。これにより、CRDS 測定中の減衰率・吸収スペクトルのモニタリングが可能となった。開発した信号処理システムを用いて、カラムより放出された試料由来 CO_2 ガスが分析セルに到達する時間分布を評価した結果、カラム温度が上昇し始めてから CO_2 ガスが分析セルに到達するまでの時間はほぼ一定であったことから、カラム温度の上昇をトリガーとして複数の電磁バルブを制御する体系を開発した。また、CRDS 分析セル内の CO_2 分圧を高める導入手法を開発し、その有用性を示した。同様に、カラムの後段に液体窒素冷却に基づく CO_2 トラップを導入し、その CO_2 分圧向上効果を確認した。

第3章 中赤外 CRDS に基づく ^{14}C 分析法の高感度化に関する研究

第2章にて構築された ^{14}C -CRDS 分析システムの分析感度は、生体試料分析に適用するには不十分であり、感度向上を図る必要があった。そこで本章では、 ^{14}C -CRDS 分析法の高感度化に関する研究として、CRDS 分析において分析感度・分析精度がどのような要因で制限されるかについて説明し、バックグラウンド抑制法・中赤外半導体レーザーの発振周波数安定化法を開発した。

^{14}C -CRDS 分析法について、取得される吸収スペクトルのバックグラウンド変動は分析感度を決定づける大きな要因であるが、特にバックグラウンドがレーザー周波数に対し周期的に変動するエタロン効果の影響が大きいと見積もられた。エタロン効果は、光共振器を構成する2つの高反射面外に存在する、何らかの反射面による疑似共振が要因で引き起こされる。その影響を低減する手法として、差し引き法・ブリュースタースポイラーによる抑制法・共振器温度変調による抑制法を検討し、 ^{14}C -CRDS 分析システムにてその効果を評価した。バックグラウンド変動の抑制結果として、ブリュースタースポイラーの有無によるバックグラウンドスペクトル (Fig. 2(a)) とそのフーリエ変換結果 (Fig. 2(b)) を示す。ブリュースタースポイラーにより周期約 600 MHz (= 疑似共振長で 25 cm) の振動が抑制されたことが示された。これは、ブリュースタースポイラーによって疑似共振長が変調され、時間平均により周期的振動が平滑化された結果である。ブリュースタースポイラーと温度変調を組み合わせることで、エタロン効果を 100 s^{-1} まで低減させることができ、アバundance感度にして $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 相当であることが明らかとなった。

天然同位体比以下のアバンダンス感度を達成するためには、エタロン効果を完全に抑制することに加えて、 ^{14}C -CRDS 分析システムで使用される DFB-QCL の発振周波数を光共振器の共鳴条件に対して十分なレベルまで安定化・狭帯域化する必要がある。 ^{14}C -CRDS 分析において使用される光共振器の共鳴条件線幅は約 20 kHz と非常に狭く、光共振器とレーザー光源との高安定・高効率なカップリングは分析感度・精度向上に大きく寄与する。そこで中赤外レーザーの出力光の一部をレーザーに入射させる手法 (Passive feedback 法) を適用し、中赤外半導体レーザーの発振線幅を約 350 kHz まで狭帯域化することができた。さらに、中長期的な安定性向上を目的として、中赤外光周波数コムを用いた手法を開発し、周波数不安定性が 1 MHz 以下 (5 分間) まで抑えられることを示した。また、制御のセットポイント周波数を変調することで中赤外半導体レーザーの発振周波数を安定化しつつ、掃引する手法を開発し、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより、炭素同位体 (^{12}C ・ ^{13}C ・ ^{14}C) を含む二酸化炭素の吸収スペクトルを測定した。繰り返し測定による誤差が安定炭素同位体比で 1 桁、 ^{14}C で 2 分の 1 程度減少し、目標であった 1% 以下の測定精度を達成した。

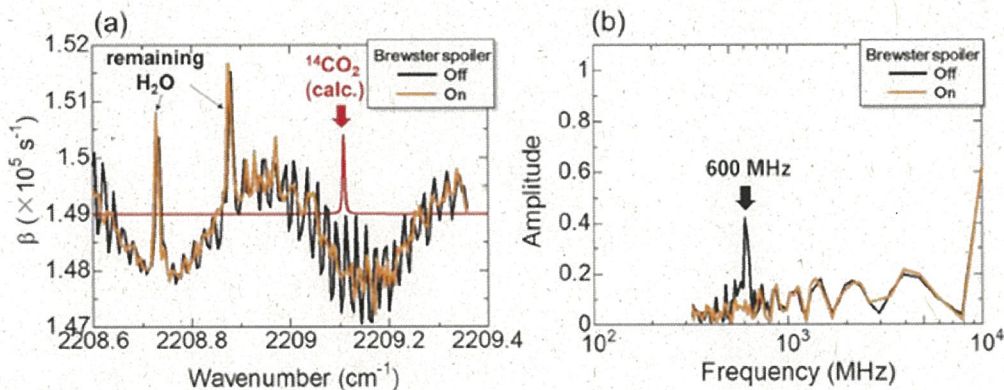


Fig. 2 ブリュースタースポイラー有無によるバックグラウンドの比較
(a) バックグラウンドスペクトル (b) フーリエ変換

第 4 章 生体試料中 ^{14}C 分析性能の評価

本章では、 ^{14}C -CRDS 分析システムを用いて ^{14}C 標準試料を分析し、 ^{14}C 同位体比を測定することで定量性とアバンダンス感度を評価した。

^{14}C 定量性を評価するために、 ^{14}C 濃度の異なる複数の ^{14}C 標識グルコース溶液を用意し、それぞれについて ^{14}C -CRDS 分析システムにて ^{14}C 同位体比を測定した。結果より、取得された同位体比に試料中 ^{14}C 量に対する良好な線形性を確認した。また、測定されたスペクトルの信号対雑音比より、現状のアバンダン

ス感度は $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ と評価され、検出限界は $1.7 \times 10^{-3} \text{ Bq/sample}$ (= 0.1 dpm/sample) と評価された (Fig. 3)。

医薬品開発におけるヒトトレーサー応用への適用検討として、ヒト生体試料 (尿・血漿) に ^{14}C 標識グルコースを微量添加したヒト生体模擬試料を測定する基礎実験を行った。取得された吸収スペクトルに明瞭な $^{14}\text{CO}_2$ のピークを確認でき、ヒト生体試料中の ^{14}C を測定可能であることを示した。

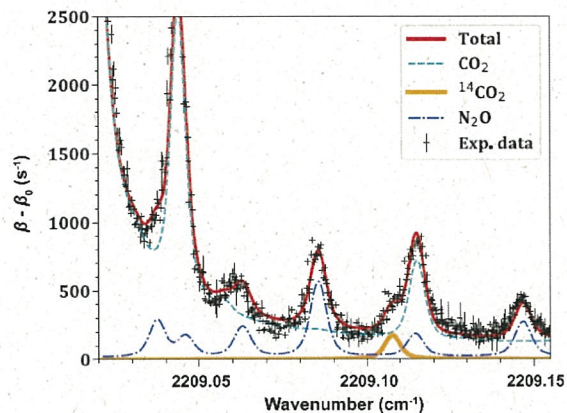


Fig. 3 $^{14}\text{CO}_2$ 吸収スペクトル ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 4.5 \times 10^{-11}$)

第5章 ^{14}C トレーサー分析への応用実証

本章では、複数領域への応用実証により、本システムの有用性を示すことを目的として、医薬品開発分野・植物生理学における ^{14}C トレーサー応用に適用する実証実験を行った。

^{14}C -CRDS 分析システムを医薬品開発分野における薬物動態評価に適用し、 ^{14}C 標識医薬品成分化合物の動物中排泄評価実験を行った。 ^{14}C 標識トルブタミド (経口糖尿病用剤) を経口投与させたラットの、各個体からの排泄物 (尿・糞) を、投与開始直後から一定時間 (24 時間) 間隔で採取した。既存の分析手法である LSC との性能比較を行うために、投与放射エネルギーに応じて 2 群用意し、投与放射エネルギーの多い (92.5 kBq/body) 群の試料については LSC で、少ない (0.925 kBq/body) 群の試料については ^{14}C -CRDS 分析システムにてそれぞれ ^{14}C 量を測定した (Fig. 4)。両手法による結果を比較すると、累積排泄率の時間変化が一致

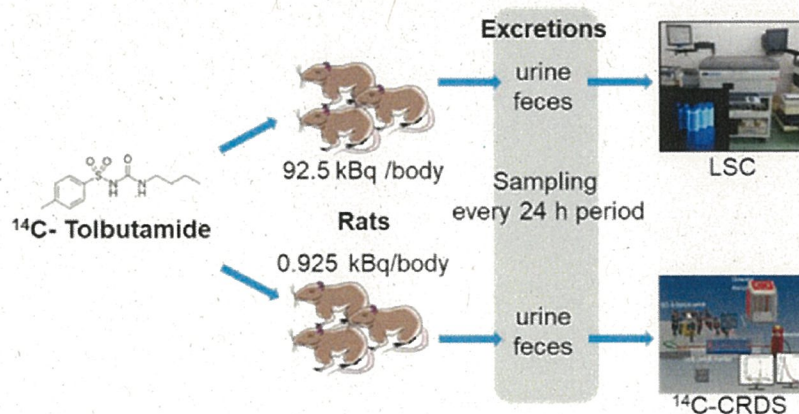


Fig. 4 ラット中トルブタミドの排泄率評価実験概要

しており、 ^{14}C -CRDS 分析システムでは LSC より 100 倍少ない投与放射エネルギーで薬物の排泄を評価可能であることが示された。これにより、投与放射エネルギーに制限（最大 18.3 kBq/body）のあるヒトに対する薬物動態試験に適用可能であることが示唆された。

植物生理学において、乾燥ストレスなど異なる条件下で栽培した作物にはその生育具合に大きな差異が見られ、光合成産物の動態が異なることが示唆されている。本章では、イネ中炭素動態評価の実証実験を通して、植物生理学における ^{14}C トレーサー分析への ^{14}C -CRDS 分析システムの適用検討を行った。

まず、炭酸水素ナトリウムと酸の化学反応を利用した植物試料用 $^{14}\text{CO}_2$ ラベリングシステムと、植物試料のような固体試料を燃焼可能な試料導入部を構築した。次に、乾燥ストレス有/無の条件下で生育したイネ試料（それぞれ 20 個体ずつ）に対し、ラベリングシステムより発生させた $^{14}\text{CO}_2$ を光合成により吸収させ（約 5.5 MBq、60 分間）、各イネ試料を根系と茎葉部に分け、 ^{14}C -CRDS 分析システムにより測定した。取得されたスペクトルの一例を Fig. 5 に示す。根と葉の同位体比の差を経過時間ごとに比較すると、葉によって生成された ^{14}C を含む光合成産物が、時間の経過とともに根に移動していることが示された。また、乾燥ストレスの有無では、その動態に差異があることが明らかになった。これにより、本手法によるイネ中炭素動態評価が実証された。第 4 章にて評価された分析システムの分析感度から、投与放射エネルギー、または試料量がさらに数桁少なくても同様の結果が得られると予想され、各部位毎の ^{14}C 濃度測定や呼気中 ^{14}C 濃度のモニタリングなどへの本システムの適用が期待される。

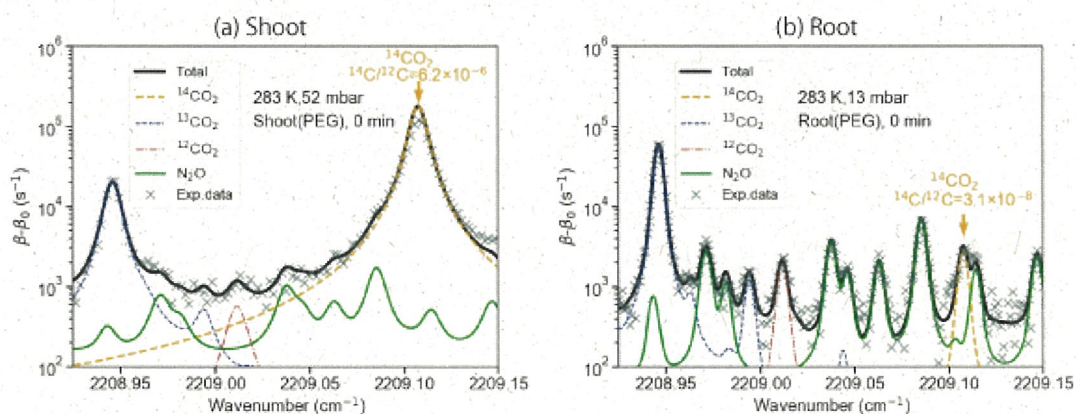


Fig. 5 取得された吸収スペクトル（イネ同一個体、乾燥ストレスあり）
(a) 茎葉部 (b) 根系

第6章 結論と今後の展望

本章では、本研究の結論と今後の展望について述べる。中赤外 CRDS による ^{14}C 分析法、分析システム (^{14}C -CRDS 分析システム)、およびその高感度化に関する開発を行った。また、 ^{14}C 標準試料や生体模擬試料を用いた基礎実験により、本システムが、アバンダンス感度 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C} \sim 2 \times 10^{-11}$ 、検出限界 $1.7 \times 10^{-3} \text{ Bq/sample}$ (= 0.1 dpm/sample)、測定精度 1%以下の性能を有し、前処理なく生体試料の測定が可能で、上記性能を 15 分以内の測定で実現できることを示し、トレーサー応用に求められる ^{14}C 分析性能を備えていることを明らかにした。最後に、薬物動態学や植物生理学における ^{14}C トレーサー分析に本手法を適用し、その有用性を実証した。

今後の展望として、レーザー周波数安定化・狭帯域化、バックグラウンド抑制により、天然同位体比、またはそれ以下のアバンダンス感度が実現でき、医薬品開発領域におけるヒトトレーサー応用や植物生理学における作物中炭素動態の評価をはじめとして、高い感度とスループットが同時に求められる種々の ^{14}C 分析応用への本分析法の適用が望まれる。また、本分析法と ^{14}C トレーサーを組み合わせ、呼気中 ^{14}C 濃度の直接分析や、代謝物中 ^{14}C 分析など、生体・環境中の様々な動態を高感度に評価する手法が開発され、これまでにない新たな知見の創出が期待される。