

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07143

研究課題名（和文）プラチナ系抗癌剤によるバイオメタル関連タンパク質の生体内分布変動解析

研究課題名（英文）Effects of platinum-containing drugs on tissue and cellular distribution of trace metal-related proteins

研究代表者

中村 任（Nakamura, Tsutomu）

大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80379411

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：限られた量の臨床検体について金属元素を効率的に測定するための前処理としてマイクロ波試料分解装置を用いた灰化条件を検討し、処理条件の最適化を行った。プラチナ系抗癌薬投与後は生体内で長期にわたり検出されるが、その血中からの消失は腎機能に依らずアルブミンなどの因子と関連することが示唆された。また、同患者サンプルについて生体内必須微量元素の変動に加え、同位体効果についても検討したところ、血漿中の鉄、銅、亜鉛の同位体比は自然比と比べて差異がある可能性があり引き続いての検討課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラチナ系抗癌剤は消化器癌などの固形癌に対して汎用される薬剤である。一方で、プラチナが金属であることから同薬剤を用いる治療によって鉄、銅、亜鉛といった生体に必須の微量元素（バイオメタル）に影響する可能性がある。バイオメタルの変動をモニターすることによって生体が受けた影響を定量的に評価できる可能性があり、疾患の診断や治療効果の判定ならびに副作用の発現予測に応用できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Limited quantities of clinical samples are available. As a pretreatment for efficient measurement of metal elements, the conditions for ashing using a microwave sample digester were investigated, and the treatment conditions were optimized. After platinum-based chemotherapy, it is detected in the body for a long period of time, and it was suggested that its elimination from the blood is related to factors such as albumin, regardless of renal function. In addition to the variation of essential trace metals in the body, the isotope effect was also examined for the same patient samples, and it was found that the isotopic ratios of iron, copper, and zinc in the plasma may differ from the natural ratios. Further studies are required.

研究分野：臨床薬学

キーワード：プラチナ 癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内微量元素(バイオメタル)は生命現象と深く関わっている。申請者はこれまでに、バイオメタルが金属であることに着目し、癌化学療法で汎用されるプラチナ系抗癌薬投与後の影響を患者血液検体を用いて検討してきた。その中で、一部のバイオメタルでは血中動態が変動することを明らかにしてきたが、組織中の変動をどのように反映しているかは不明な点が多い。

(2) バイオメタルの測定には誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて行うが、測定前処理としてサンプルを強酸により湿式灰化し、サンプルを完全に乾固させた上で、硝酸溶液に再溶解して測定を行ってきた。これまでの方法では前処理にかかる時間が長いため、1日で処理できるサンプル数が少なく、効率的にバイオメタルを測定する上で問題となっていた。

(3) 一部のバイオメタル(鉄、銅、亜鉛)には安定同位体が存在し、近年、バイオメタルの同位体比率が性別や疾患などの患者背景および癌化学療法後の予後などと関連することが報告されている。しかしながら、生体内のどのような現象をどの程度反映しているかは不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

(1) プラチナ系抗がん剤投与患者における長期の消失過程に影響を及ぼす要因解明のため、プラチナの濃度濃度推移と臨床検査値との連関解析を行う。

(2) 閉鎖型容器を用いるマイクロ波試料分解装置の利用が可能となったため、臨床サンプルを含めた試料の灰化処理について同装置の加熱プログラムの最適化を行う。

(3) プラチナ系抗がん剤投与患者におけるバイオメタルの同位体比の変動を評価し、変動が認められる場合の変動因子について解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究は、神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委員会の承認を得た後、患者から文書による同意を取得して実施した。癌化学療法(シスプラチン[CDDP]/5-フルオロウラシル[5-FU]併用、CDDP/ペメトレキセド併用投与、カルボプラチン/パクリタキセル併用)を施行した食道癌患者7症例、肺癌患者8症例、胸腺腫1名を対象とした。検討可能な血漿サンプルについて、プラチナ系抗がん剤最終投与後の観察終了日は、食道癌135日(四分位範囲:121-562日)、肺癌368日(四分位範囲:133-550日)、肺腺腫193日であった。ICP-MSを用いたプラチナの定量には $^{195}\text{Pt}$ を用い、検出限界を0.1 ng/mLとした。臨床検査値等の患者情報は電子カルテより抽出した。

(2) バイオメタルの測定は、サンプルの湿式灰化を行い、ICP-MSを用いて行った。サンプルの灰化容器には耐熱性・耐酸性に優れたポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製容器を用い、湿式灰化では、サンプルに強酸を添加後、マイクロ波試料分解装置を用いて加熱分解処理を行った。なお、マイクロ波照射時間等のプログラムの最適化条件は、サンプル中に含まれる有機物が十分に酸化されサンプル溶液が無色透明になったことを確認できる条件で設定した。強酸溶液である灰化処理後のサンプルは、超純水で希釈し、ICP-MSでの測定に供した。

(3) 安定同位体が存在するバイオメタルとして鉄( $^{54}\text{Fe}$ 、 $^{56}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Fe}$ )、銅( $^{63}\text{Cu}$ 、 $^{65}\text{Cu}$ )、亜鉛( $^{64}\text{Zn}$ 、 $^{66}\text{Zn}$ )を対象とし、血漿サンプル中の各同位体について検討した。なお、ICP-MSを用いた鉄、銅、亜鉛の元素の定量には、それぞれ $^{56}\text{Fe}$ 、 $^{63}\text{Cu}$ 、 $^{66}\text{Zn}$ を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) マイクロ波試料分解装置を用いた灰化条件の検討

これまでバイオメタルの測定にはICP-MSを用いており、測定サンプルの前処理として開放型容器を用いて強酸による湿式灰化を行ってきた。開放型容器の使用は完全乾固できるメリットがある一方で、コンタミや作業効率性の点で懸念もあった。一方、本研究でサンプル前処理に用いたマイクロ波試料分解装置では閉鎖型容器を用いることから、コンタミや作業効率性の点で優位性がある。しかしながら、マイクロ波照射の強度や時間の条件はサンプルの種類や量ならびに添加する強酸の種類や量によっても最適化条件が異なることから、同装置の加熱プログラムの最適化について検討した。先行文献も参考にしながら混酸の種類や比率、灰化の温度や時間を変更しながら検討した結果、血漿サンプル50  $\mu\text{L}$  に対して混酸1 mL(65%硝酸:35%過酸化水素

= 2 : 1) を用い、灰化温度と時間は 120 ℃、30 分で十分に灰化できることを確認した。また、試料の灰化容器として PTFE 製容器を用いて検討を進めたところ、マイクロ波加熱処理時に容器変形に伴うサンプルの漏出など測定精度に影響を及ぼすことが考えられたが、灰化時に 120 ℃ に加熱するまでに 30 分を必要とする設定とすることで急激で過度な加熱を抑制し、容器内溶液の損失を最小限度に留めて灰化処理可能なことを確認した。測定サンプルは、測定のたびにサンプルを消費することとなり、患者血液検体など希少サンプルを用いる場合には再測定などのことを考え、できるだけ少量のサンプル量で測定でき且つ精度を落とさずに測定することが求められる。今回の条件はこれら諸条件を十分に満たすものと考えられた。以後の血漿サンプルを用いた研究成果については、既述の条件で灰化処理を行った結果を示している。

( 2 ) プラチナ最終投与日 1 ヶ月以降のプラチナ血漿中濃度推移と臨床検査値との関連解析  
 対象患者のうちプラチナ血漿中濃度推移の評価が可能であった患者は、食道癌 CDDP / 5-FU 併用療法施行患者 6 名および肺癌カルボプラチン / パクリタキセル併用療法施行患者 1 名であった。各プラチナ系抗がん剤最終投与後 29 日 ~ 590 日の血漿サンプルを、マイクロ波試料分解装置による灰化処理後、ICP-MS で測定した。その結果、評価期間においてプラチナはその血漿中濃度に比例して消失する一次速度過程をとった ( 図 1 )。消失速度定数から算出されるプラチナの血

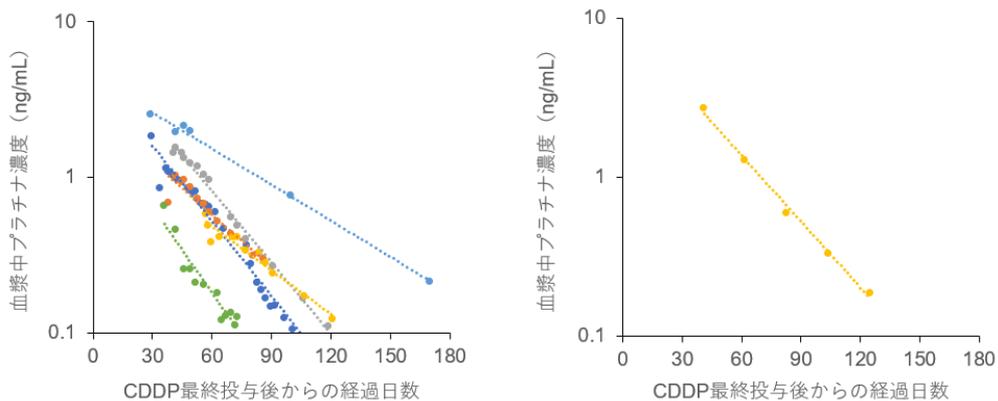


図 1 CDDP (左図) およびカルボプラチン (右図) の最終投与後の経過日数とプラチナ濃度との関係

中半減期は、CDDP 投与患者で 394 時間 (16.4 日) から 1,102 時間 (45.9 日)、カルボプラチン投与患者で 521 時間 (21.7 日) あった。前者については、既報 (Nakamura *et al.*, *Biomed Rep* (2016)) と同一患者におけるシスプラチン投与後約 1 ヶ月までの半減期と比較して 1.4 倍から 2.3 倍の値であり、半減期が延長する傾向にあった。シスプラチンは主に腎臓から排泄されるが、観察期間中のプラチナの半減期と平均血清クレアチニン値との間に相関関係は認められなかった ( 図 2 )。一方、シスプラチンは血中でアルブミンと強く結合することが報告されており、観察期間中のプラチナ半減期と平均血清アルブミン値との間に良好な相関関係が認められた ( 図 2 )。血清アルブミン値が低い患者における相対的に早い血中からのプラチナ消失はシスプラチンが血管外組織に移行しやすいことを反映している可能性があり、低栄養状態で末梢性神経障害の発症リスクが高まる報告とも矛盾しない結果と考えられた。

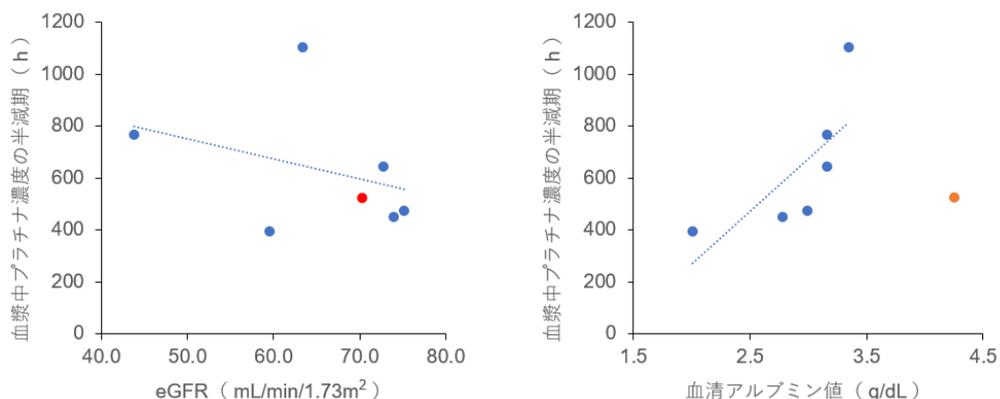


図 2 血漿中プラチナ濃度と eGFR (左図) および血清アルブミン値との関連性

図中の臨床検査データは、各患者における観察期間中のデータの平均値であり、シスプラチンおよびカルボプラチン投与患者のデータをそれぞれ青と赤のマーカーで示した。点線はシスプラチン投与患者のデータ (青点) のみを用いて線形回帰したものである。 eGFR : 推定糸球体濾過速度

### (3) プラチナ投与患者における生体内金属の同位体比変動評価

銅には  $^{63}\text{Cu}$  と  $^{65}\text{Cu}$  の安定同位体が存在することが知られており、銅は相対的に質量の軽い  $^{63}\text{Cu}$  が優先して生体反応に利用されると推察される。銅は生体内においては骨や骨格筋に約 50%、肝臓中に約 10% 存在し、ホメオスタシスは厳密に調節されているが、肝機能の低下に伴って銅が関連する反応が制限された場合、銅の生体反応が盛んな部位では特に安定同位体比が変動する可能性が考えられる。本研究では、CDDP / 5-FU 併用療法を施行された食道癌患者 1 名のシスプラチン最終投与 29 日以後 590 日目までの血液検体を用いて、臨床検査値とバイオメタルの変動について同位体比に着目して解析を行った。その結果、当該患者は観察期間中、ALT や AST によって評価される肝機能に一過性の障害が認められており、血漿中銅濃度はそれに先だって一過性の上昇を認めた (図 3)。

$^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  によって表される同位体比を肝障害未発現時と肝障害発現以降とで比較したところ、血漿中の同位体比は前者で 0.51、後者で 0.49~0.52 の値であり著しい変化は認められず、一過性の肝障害発現が血漿中の銅の同位体比に与える影響は小さいと考えられた。

国際純正・応用化学連合 (IUPAC) 無機化学部門の原子量および同位体存在度委員会 (CIAAW) が公表している元素の同位体存在度の値によれば  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  の値は 0.446 ( $=0.3085/0.6915$ ) であり、今回検討した血漿サンプルの銅の同位体比は標準値よりも高値であった。血漿中に存在する  $^{65}\text{Cu}$  の割合が相対的に高いことを示す結果であったが、標準品を用いた  $^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$  同位体比分析法のバリデーションが十分に行えておらず、同位体比が高値となった原因については今後の研究課題として残された。Balter らは安定同位体比の測定が癌の代謝変化を検出するのに役立つ可能性を示唆している (*Proc Natl Acad Sci USA* (2015))。今回の患者由来の同位体比と自然比とで認められた差異は患者背景が同位体比に影響していた可能性を否定できず、また、プラチナ系抗がん剤による化学療法を施行した影響についても不明である。一方で、 $^{54}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ 、 $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$  の評価も行ったが、血漿中バイオメタル変動と関連した同位体比の変動は認められなかった。疾患などの患者背景や化学療法の実施などが同位体比に及ぼす影響については今後症例数を増やして検討するなど、その影響を明らかにする必要がある。

### (4) 細胞培養液中のバイオメタル分析法のバリデーション

培養細胞を用いたバイオメタル変動実験を行うための基礎データとして、培養液中のバイオメタル測定法のバリデーションを行った。DMEM 培地に対して抗生物質や FBS (牛胎児血清) を添加して調製した Growth 培地について、鉄、銅、亜鉛の測定を行った。灰化や添加試料の影響についてベースラインの値を確認するとともに、規定の濃度のバイオメタルおよびプラチナを添加した場合の検量線について検証した。その結果、銅やプラチナを測定する目的であれば必ずしも灰化の必要がないことが確認された。硝酸溶液による適度な希釈によって一部のバイオメタルの測定が可能であることが確認できた一方で、FBS を添加して調製するような Growth 培地では鉄や亜鉛の測定のためには灰化处理が必要であった。したがって、効率的に複数のバイオメタルを同時に測定するためには灰化处理を行うプロトコルの作成が必須であると考えられた。

以上、本研究を通じて、限られた量の臨床検体中についてバイオメタルを効率的に ICP-MS で

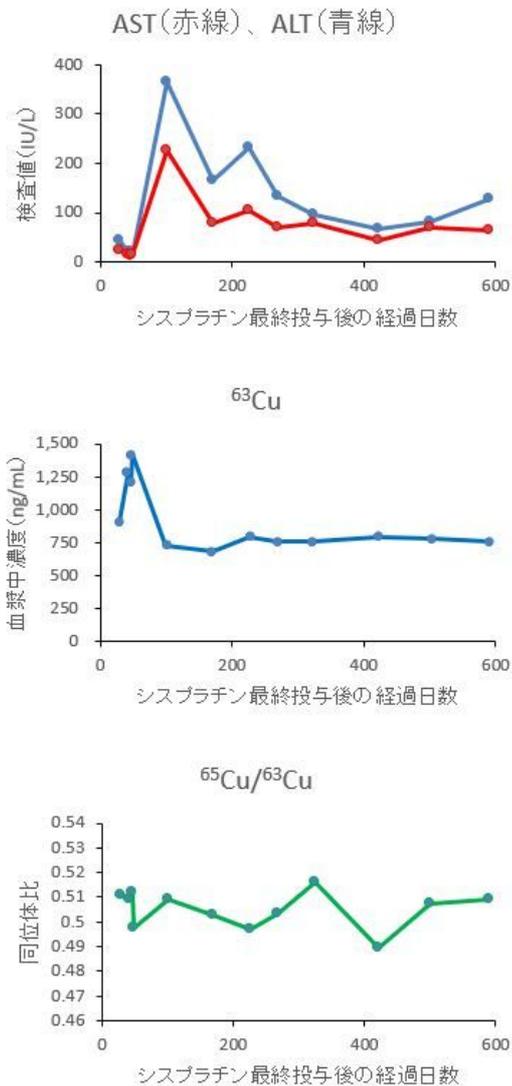


図3 食道癌 CDDP/5-FU 併用療法後の患者 1 名における CDDP 最終投与後の経過日数に伴う肝機能と血漿銅濃度の変化

測定するための前処理としてマイクロ波試料分解装置を用いた灰化条件を検討し、処理条件の最適化を行った。腎排泄型薬物であるシスプラチンの化学療法施行後の体内動態からの消失は必ずしも腎機能には依らずアルブミンなどの他因子との関連性が示唆されたことは、シスプラチンの長期蓄積による副作用発現を予防する上で有用な知見と考える。また、プラチナ系抗癌剤を含む化学療法施行後のバイオメタル変動の評価については、生体内分布に加え、各臓器・組織での機能変動に対応させた定量的評価が必要なこと、また、バイオメタルの同位体効果については臨床症例数を増やして絶対値および相対値を指標とした評価が必要であり、臨床上の有用性については引き続きの検討課題として残された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazuki Matsui, Yutaro Mukai, Kota Sakakura, Kyoichi Wada, Tsutomu Nakamura, Atsufumi Kawabata, Nobue Terakawa, Naoki Hayakawa, Kengo Kusano, Kouichi Hosomi, Satoshi Yokoyama, Mitsutaka Takada.	4. 巻 59
2. 論文標題 Relationship between serum bepridil concentration and corrected QT interval	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 63～70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5414/CP203843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Megumi Ikura, Tsutomu Nakamura, Takaya Uno, Kazuki Nakagita, Hiromi Takenaka, Sachi Matsuda, Ryosuke Oda, Kyoichi Wada, Yuji Hattori, Osamu Seguchi, Masanobu Yanase, Naoki Hayakawa, Norihide Fukushima.	4. 巻 59
2. 論文標題 Discontinuation of oral amphotericin B therapy does not influence the pharmacokinetics of tacrolimus in heart transplant patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 566～571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5414/CP204005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mai Otokubo, Kyoichi Wada, Megumi Ikura, Kotoka Hayase, Takaya Uno, Kazuki Nakagita, Naoki Hayakawa, Takuya Watanabe, Osamu Seguchi, Norihide Fukushima, Tsutomu Nakamura.	4. 巻 45
2. 論文標題 Risk Assessment of Neutropenia during Low-Dose Valganciclovir Prophylaxis for Heart Transplant Recipients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 452～459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 UCHIDA MAYAKO, MURATA SAEKO, MORIKAWA HANAE, YONEMITSU HIROKO, ISHIDA SHIGERU, SUETSUGU KIMITAKA, TSUJI TOSHIKAZU, WATANABE HIROYUKI, KAWASHIRI TAKEHIRO, KATO KOJI, HOSOHATA KEIKO, MIYAMOTO TOSHIHIRO, EGASHIRA NOBUAKI, NAKAMURA TSUTOMU, AKASHI KOICHI, IEIRI ICHIRO	4. 巻 42
2. 論文標題 Usefulness of Medication Guidance Sheets for Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma Receiving ESHAP±R Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2053～2060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 UCHIDA MAYAKO, KAWAI RIKA, HISAMITSU RIE, MAI SAYAKA, ISHIDA SHIGERU, WATANABE HIROYUKI, KAWASHIRI TAKEHIRO, KATO KOJI, HOSOHATA KEIKO, MIYAMOTO TOSHIHIRO, EGASHIRA NOBUAKI, NAKAMURA TSUTOMU, AKASHI KOICHI, IEIRI ICHIRO	4. 巻 36
2. 論文標題 Evaluation of Medication Instruction Sheets for Patients Undergoing R-CHOP Therapy in Non-Hodgkin's Lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1461 ~ 1467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12852	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiko Yamashita, Takashi Ogihara, Maho Hayashi, Takayuki Nakagawa, Yuma Ishizaki, Manabu Kume, Ikuko Yano, Riho Niigata, Jun Hiraoka, Hiroyuki Yasui, Tsutomu Nakamura.	4. 巻 75
2. 論文標題 Association between dexamethasone treatment and alterations in serum concentrations of trace metals.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 218-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1691/ph.2020.0341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Mayako, Yamaguchi Yuki, Hosomi Syuheji, Ikessue Hiroaki, Mori Yasuhiro, Maegawa Nami, Takano Aoi, Sato Yuki, Hosohata Keiko, Muroi Nobuyuki, Tomii Keisuke, Hashida Tohru, Nakamura Tsutomu	4. 巻 43
2. 論文標題 Risk Factors for Febrile Neutropenia Induced by Docetaxel Chemotherapy in Patients with Non-small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1235 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Mayako, Mori Yasuhiro, Akiba Kenta, Miyasaka Moena, Hirano Tatsuya, Ikessue Hiroaki, Yamaguchi Yuki, Takano Aoi, Maegawa Nami, Shimomura Yoshimitsu, Hosohata Keiko, Muroi Nobuyuki, Ishikawa Takayuki, Hashida Tohru, Nakamura Tsutomu	4. 巻 43
2. 論文標題 Risk Factors for Skin Toxicities Associated with Bendamustine-Based Chemotherapy in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安井 裕之  (Yasui Hiroyuki)		
研究協力者	山本 和宏  (Yamamoto Kazuhiro)		
研究協力者	矢野 育子  (Yano Ikuko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------