

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82514

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350586

研究課題名(和文) BNCTにおける血液中のBSHとBPA由来別の硼素同位体濃度推定法の開発

研究課題名(英文) Development of an analytical method for individual boron concentration determination from combination of BSH and BPA in human plasma for BNCT

研究代表者

畢 春蕾 (BI, CHUNLEI)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員

研究者番号：80647321

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)：BNCTの治療効果を向上させるために、B-10を標識した取り込み機構の異なる2つのホウ素化合物(BSHとBPA)を併用して腫瘍部のホウ素濃度を高める手法が実施される。中性子照射による正確な線量評価を行うには血液中のBSHとBPAを個別に濃度測定することが要求される。本研究は液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)を用いて、血漿試料における2つのホウ素化合物の分離条件及び化合物ごとの濃度の定量分析手法を確立した。今後は本研究の成果を踏まえて、動物への投与実験を利用して本定量分析法を検証する予定である。

研究成果の概要(英文)：For improvement of the therapeutic efficacy, combined medication of both sodium borocaptate (BSH) and p-boronophenylalanine (BPA) enriched with  $^{10}\text{B}$ , are applied in BNCT clinical studies at present, because this technology loaded of BSH and BPA simultaneously is expected to increase the accumulation of boron concentration in the tumors. Therefore, it is required to measure the individual boron concentration derived from the two different compounds respectively for the accurate dose estimation by neutron irradiation. In this study, an analytical method on the separation of the two boron compounds and individual concentration determination by using a liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) has been developed and the applicability to human plasma samples has been also studied. This analytical method is more practical and easier for individual boron concentration determination from combination of BSH and BPA for BNCT. Furthermore, animal injection experiment is under research.

研究分野：分析化学

キーワード：BNCT BSHとBPA併用 LC/MS 定量分析 ICP-MS ホウ素濃度

1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) は難治性がんに対する次世代のがん治療法として、期待されている。悪性脳腫瘍に対する近年の臨床研究では、治療効果を向上させるために、<sup>10</sup>B を標識した取り込み機構が異なる 2 つのホウ素化合物 BSH (sodium borocaptate) と BPA (p-boronophenylalanine) を併用して腫瘍部のホウ素濃度を高める手法より実施されている。中性子照射による線量評価に用いられる BSH と BPA の RBE (Relative Biological Effectiveness, 相対的な生物学的効果比) の値が異なっているため、正確に線量評価を行うには BSH と BPA の濃度を個別に定量することが要求される。しかしながら、BNCT の臨床研究に適用されるホウ素濃度の測定方法として、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) 及び誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) が主流であり、2 剤が併用する際、BSH と BPA を分離せず、血液中のホウ素全量を定量の対象としている。

2. 研究の目的

高速液体クロマトグラフ質量分析計 (Liquid Chromatography Mass Spectrometry, 以下は LC/MS) による 2 つのホウ素化合物 (BSH と BPA) の分離や定量分析の手法、及び高分解能誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, 以下、「ICP-MS」という) によるホウ素同位体濃度の測定手法を組み合わせることで推定手法の確立することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) LC/MS: 高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS、島津社製) を用いた。モデル実験を実施するために、[BSH+BPA] の混合標準溶液を用いて、LC による BSH と BPA の分離条件 (移動相種類、カラムの選択等) 及び MS 測定条件を最適化した。また、標準溶液による絶対検量線の検討や目的成分を含むヒトの血漿試料を用いたバリデーションを行った。

(2) ICP-MS: 高分解能 ICP-MS (ELEMENT XR, Thermo Fisher Scientific) を用いて全血液を測定の対象としたホウ素同位体 (<sup>10</sup>B、<sup>11</sup>B) 濃度及び同位体組成比を確認した。

(3) LC/ICP-MS: 本研究で使用した LC/MS は、分析システムと分取システムの両方が整備されている。分取 LC/MS システムにて、分取条件の最適化の検討を行い、分取された目的成分 (BSH と BPA) を含むフラクション試料をそれぞれ回収し、ICP-MS によるホウ素同位体濃度を確認した。

4. 研究成果

(1) BSH と BPA の分離

LC/MS による BSH と BPA の分離を達成するためのメソッドの作成において、分析試料

(BSH と BPA の標準品) の溶解性や LC/MS 移動相の種類及び分離カラムの 3 者間の相互作用を適切に調整し、分析条件を最適化した。

LC/MS の分析試料は移動相溶媒に溶解することが前提条件であるため、目的成分 BSH は極性化合物であり、極性溶媒 (水、メタノール、アセトニトリル) への溶解性が良好であることを確認した。一方、BPA は両性化合物として機能しているが、中性領域で水への溶解度が低く (25°C で 1.6g/L)、目的成分を分離するために、移動相はメタノールが最適であることが明らかになった。

BSH と BPA の分離は、汎用される移動相溶媒「0.1%ギ酸入り水溶液 (または酢酸アンモニウム) とメタノールの混合液」を LC/MS の移動相として検討した結果、BSH の検出感度が低いことや BSH は ODS カラムへの保持が弱く、BPA との分離が難点であった (Fig. 1)。

目的成分の分離を重視する LC 移動相の検討とイオン化効率を重視する MS 測定条件の両方に釣り合った条件の決定がメソッド開発の鍵となる。本研究では、移動相溶媒中に酸性物質用のイオンペア試薬 DHAA

(Di-hexylammonium Acetate, 東京化成) を添加し、水溶性の高い BSH と異符号のイオンペア試薬と結合することによって、BSH の疎水性向上を図った (Fig. 2)。BSH は ESI (+) 測定で m/z 723 のイオンピーク [<sup>10</sup>B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>SH • 3C<sub>12</sub>H<sub>28</sub>N]<sup>+</sup> が検出された。一方、BPA は ESI (-) 測定で m/z 207 のイオンピーク [M-H]<sup>-</sup> が検出された。保持時間について、BPA は 5.0min. に、BSH は 17.9min. にピークが現われ、BSH と BPA は完全に分離されることが認められた。

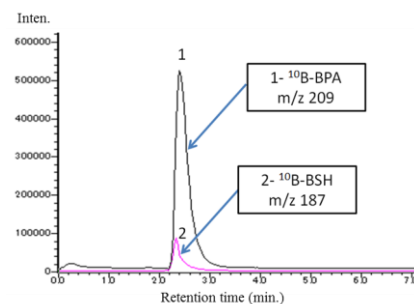


Fig. 1 BSH と BPA のクロマトグラム (分離不可能の例) 「移動相: 0.1%ギ酸入り水溶液/メタノールの混合液」

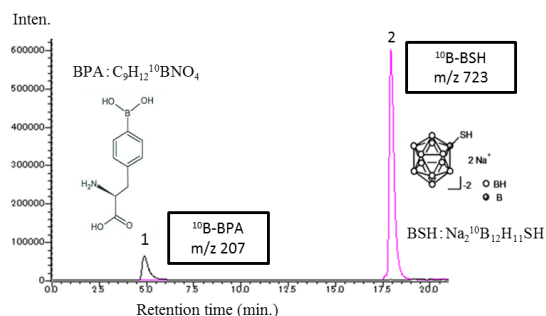


Fig. 2 BSH と BPA のクロマトグラム (分離可能な例) 「移動相: DHAA/メタノールの混合液」

## (2) LC/MS 定量分析法

### ① 絶対検量線

絶対検量線の直線性及び目的成分の保持時間における繰り返し再現性を確認するために、(BSH+BPA)の混合標準溶液を用いて、0.001~100.0 ( $\mu\text{g/ml}$ )の濃度範囲で段階希釈した15点の異なる濃度レベルの測定試料について調べた。検量線の作成は、確認された化合物のマススペクトルからBSHにはm/z 723、BPAにはm/z 207を指定し、SIM(Selected Ion Monitoring)モードによる測定を行った。濃度範囲の取り方によって直線の傾きが変わるが、BSHは0.5~5.0  $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、BPAは1.0~10.0  $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で、検量線の相関係数( $R^2$ )が0.9999以上であり、非常に良い相関であることが示された(Table 1)。また保持時間の繰り返し再現性(RSD%)にも良好な結果が得られた。

Table 1 絶対検量線の直線性と保持時間の再現性

<sup>10</sup> B-enriched compound	<sup>10</sup> B-BSH	<sup>10</sup> B-BPA
Exact mass	210.30	208.08
ESI	ESI(+)	ESI(-)
Mass to charge ratio	m/z 723	m/z 207
Concentration range	0.5~5.0 $\mu\text{g/ml}$	1.0~10.0 $\mu\text{g/ml}$
Correlation coefficient ( $R^2$ )	> 0.9999	> 0.9999
Retention time (Mean, N=6)	17.9 min.	5.2 min.
Retention time (RSD%, N=6)	< 0.1%	< 3.0%

### ② マトリックス効果

分析試料におけるマトリックス効果の有無によって検量線の作成方法を検討するために、一定濃度の標準溶液を分析サンプル[A]にして、前処理済のマトリックス(血漿のブランク試料)に標準溶液を添加し、[A]の濃度と同じにしたマトリックス試料を分析サンプル[B]にする。それぞれ濃度レベルのサンプルについて測定を行い(N=6)、得られたクロマトグラムのピーク面積を比較し、面積比[A]/[B]の値からマトリックス効果の有無を判断した。その結果、面積比[A]/[B]の値は、BSH(濃度範囲:0.1~5.0  $\mu\text{g/ml}$ )の場合は99%~108%であり、BPA(濃度範囲:1.0~25.0  $\mu\text{g/ml}$ )の場合は88%~92%であった。マトリックスによる測定誤差が15%以下(許容範囲内)であることが認められた。

また、それぞれ作成した絶対検量線とマトリックス検量線を比較した結果はFig. 3に示す。BSHについては、絶対検量線とマトリックス検量線はほぼ同じ傾きを示され、マトリックスによる有意差が見られなかった。BPAについては、2者の傾きに差が見られ、本研究では、定量分析法としてマトリックスマッチング法を選んだ。

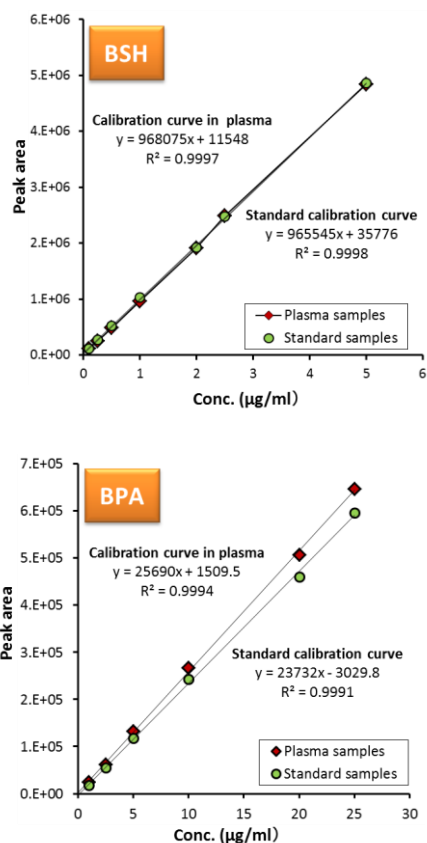


Fig. 3 絶対検量線とマトリックス検量線の比較

### ③ 分析法のバリデーション

(BSH+BPA)の混合標準溶液を添加したヒトの血漿試料を用いて、定量分析法のバリデーション試験を実施した。実施項目、実施方法並びに合否の判定方法はFDA (Food and Drug Administration 2001)基準に準拠した。

マトリックス検量線の定量範囲及び定量下限については、BSHは0.25~5.0  $\mu\text{g/ml}$ (LLOQ:0.25  $\mu\text{g/ml}$ )、BPAは1.0~25.0  $\mu\text{g/ml}$ (LLOQ:1.0  $\mu\text{g/ml}$ )であることが認められた。この定量範囲は、①定量下限における平均真度(CV%, N=6)は理論値の±20%以内、精度(RSD%, N=6)は理論値の20%以下、②定量下限以外においては、平均真度(CV%, N=6)は理論値の±15%以内、精度(RSD%, N=6)は理論値の15%以下、且つ③相関係数( $R^2$ )は0.999以上であることより決められた。また、検量線の直線性(N=6)、日内再現性(N=6)、日間再現性(N=18)、希釈再現性(N=6)についての結果はすべて判定基準に満たしていることが確認された。

### (3) ICP-MSによる主な検討

ICP-MSの測定精度について、標準物質(NIST SRM 1643e, ホウ素濃度認証値: 154.0±3.8  $\mu\text{g/kg}$ )を用いて評価した。また、比較標準化法によるホウ素同位体組成比の繰り返し測定結果より、本研究で用いたBSH及びBPAの<sup>10</sup>B同位体組成比はそれぞれ98.5%と98.8%であることが確認され、血液試料に添加した<sup>10</sup>B同位体組成比の測定結果と良く一致した。

#### (4) LC/ICP-MS による主な検討

ホウ素化合物ごとの定量分析方法の開発には、前述した LC/MS 分析法 (ホウ素化合物の分離と定量の両方が同時に実現できる方法) 以外に、化合物の分離に優れる液体クロマトグラフ (HPLC) とホウ素同位体濃度の測定に優れる ICP-MS とを組み合わせて、ホウ素化合物ごとの定量分析 (以下は LC/ICP-MS 分析法) を試みた。

分取メソッドを作成するにあたって、分取条件の最適化の検討を行った。分取カラムは島津社製 Shim-pack Gist C18 (10.0mm I.D. × 150mm, 5 μm) を選定し、流速を 5.0ml/min. に、注入量 (負荷量) を 100 μL に設定して分取を行った。また、分取 LC で得られた目的成分を含むフラクション試料をそれぞれ回収し、ICP-MS によるホウ素同位体濃度 (<sup>10</sup>B, <sup>11</sup>B) 及び同位体組成比の測定を行った。その結果、分取されたフラクション試料のホウ素濃度の測定値が理論値より高いことが判明された。これは LC/MS による分取されたフラクション試料において硼硅酸ガラス製器具やコンタミによるホウ素同位体濃度及び同位体組成比の測定への影響を完全に除去することは難しいと考えられる。

#### (5) 研究成果まとめ

本研究は、2 つのホウ素化合物である BSH と BPA を含むヒトの血漿試料における目的成分の分離方法及び化合物ごとの濃度の推定手法を確立した。LC/MS による本分析法の最大の特徴は、BSH を誘導化させる必要がなく、試料準備の手間が大幅に減少できる；目的成分 (BSH と BPA) の定性と定量の両方ができる；目的成分の検出が高感度・高選択性が有するという点が上げられる。本研究で確立した定量分析法は、BNCT の分野に先例がなく世界初である。本分析法は 2 剤が併用して実施される BNCT の臨床研究において、正確な個別ホウ素化合物の線量評価ができ、BNCT 治療効果の事後検証の手段として学術的な意義が大きい。今後、この研究成果を踏まえて、動物の投与実験による分析法の実用性の検証や開発した定量分析法の BNCT 臨床応用を目指して研究を進める予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

M. Oshima, Y. Yamaguchi, W. Muramatsu, H. Amano, C. Bi, H. Seto, S. Bamba, and T. Morimoto, Study of Charged Particle Activation Analysis (1): Determination Sensitivity for Single Element Samples, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 308, 711-719(2016)

[学会発表] (計 4 件)

- ① C. Bi, Y. Yamaguchi, S. Bamba, H. Kumada, K. Nakai, T. Morimoto, Separation and quantitation of BSH and BPA applied in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry, 8th Young Researchers of BNCT meeting, Sep. 13-17, 2015, Pavia, Italy.
- ② Y. Yamaguchi, C. Bi, S. Bamba, H. Kumada, K. Nakai, T. Matsue, T. Morimoto, Development of automatic analysis device for determination of boron in blood samples, 8th Young Researchers of BNCT meeting, Sep. 13-17, 2015, Pavia, Italy.
- ③ C. Bi, Y. Yamaguchi, S. Bamba, H. Kumada, K. Nakai, T. Morimoto, A method for individual quantitation of the combined boronophenylalanine and borocaptate by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry, 16th international congress on Neutron Capture Therapy, June 14-19, 2014, Helsinki, Finland.
- ④ Y. Yamaguchi, C. Bi, S. Bamba, H. Kumada, K. Nakai, K. E. Yamaguchi, T. Morimoto, Development of rapid and precise boron isotope analysis in whole blood by HR-ICP-MS, 16th international congress on Neutron Capture Therapy, June 14-19, 2014, Helsinki, Finland.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

畢春蕾 (BI CHUNLEI)  
日本分析センター・その他部局等  
研究員  
研究者番号：80647321

##### (2) 研究分担者

山口友理恵 (YAMAGUCHI YURIE)  
日本分析センター・その他部局等  
研究員  
研究者番号：30639977

伴場 滋 (BAMBA SHIGERU)

日本分析センター・その他部局等  
研究員  
研究者番号：40544432

大島真澄 (OSIMA MASUMI)

日本分析センター・その他部局等  
研究員  
研究者番号：40354815

森本隆夫 (MORIMOTO TAKAO)

日本分析センター・その他部局等  
研究員  
研究者番号：40544359

熊田博明 (KUMADA HIROAKI)  
筑波大学・医学医療系  
准教授  
研究者番号：30354913

(3) 連携研究者  
なし