

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82514

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870866

研究課題名(和文) BNCTにおける血中ホウ素同位体比測定法の確立と生体内におけるホウ素の動態解明

研究課題名(英文) Establishment of a method for the determination of boron in blood samples and its application to a pharmacokinetic study.

研究代表者

山口 友理恵 (Yamaguchi, Yurie)

公益財団法人日本分析センター・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：30639977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：BNCTにおいて、安全かつ効果的な治療を行うには、正確な血液中ホウ素濃度計測による適切な照射条件の管理が必要となる。本研究では、誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)を用いて、血中B-10濃度の正確かつ迅速な測定手法を確立したのち、BPA及びBSHの単独又は併用投与後、経時的に採取されたラット血液中のB-10濃度計測を行うことで、B-10の挙動傾向把握に資する基礎データの取得を行った。BPAとBSHで異なる血漿・血球間分布を示す傾向にあることが示唆された。今後は、投与条件及び分離条件を変えた検証を行うことで、薬剤が血中分布へ与える影響を明確化する予定である。

研究成果の概要(英文)：To make BNCT treatment safe and effective, precise and accurate determination of B-10 level in blood as well as accurate neutron dosimetry is required for proper control of neutron irradiation conditions. In this study, a method was developed to determine total B and B-10 content in whole blood samples based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) which makes it possible to determine the individual isotopes of each element. Then the method was applied to rat blood fractions collected serially after the administration of either BPA or BSH alone or in combination, and the distribution between rat blood cells and plasma was derived as a function of time. The results indicate that the distribution of B-10 for BPA is different from that for BSH. Further evaluation in different administration conditions will be made to clarify the behavior of the two boron compounds in blood.

研究分野：分析化学

キーワード：BNCT Boron ICP-MS BPA BSH

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞を選択的に破壊できる次世代のがん治療法として期待されるホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) では、投与薬剤として、中性子反応断面積が大きく、かつ腫瘍細胞に特異的に集積する ^{10}B を含むホウ素化合物が用いられる。BNCT の臨床研究に使用される主な薬剤は、p-Boronophenylalanine (BPA) と Sodium borocaptate (BSH) である。安全かつ効果的な治療を行うには、正確な血液中ホウ素濃度計測による適切な照射条件の管理が必要となる。原子炉施設を利用しない加速器 BNCT においては、ホウ素濃度測定方法として、誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-AES) 法が主に用いられる。本研究では、治療に寄与する ^{10}B 以外の因子を極力低減化させる為、 ^{10}B の分離測定が可能な誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法を採用した。

2. 研究の目的

本研究では、 ^{10}B 濃度の高精度・高確度・高感度測定が可能な二重収束型高分解能 ICP-MS (HR-ICP-MS) の使用により、まずは ^{10}B 濃縮薬剤を添加したヒト血液試料中の ^{10}B 濃度の計測を、続いて BPA 及び BSH を単独又は併用投与したラットより継時的に採取された血液検体中血漿及び血球成分における ^{10}B 濃度の計測を行う。

前者は、照射線量、照射時間を管理する上で重要な因子となる血中 ^{10}B 濃度を正確かつ迅速に測定できる手法の確立を目的とする。後者は、投与方法/投与薬剤が血漿・血球間分布へ与える影響に関する基礎データの取得により、血中における ^{10}B の挙動傾向を把握すること、更には測定値に影響を及ぼす諸因子の把握へと発展させることを目的とする。測定の対象が全血液である場合は、体内での、一方血漿となる場合には、採血後の検体における ^{10}B の挙動把握が大変重要となる。

3. 研究の方法

(1) 血中 ^{10}B 濃度及び $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ 測定法確立

血液の前処理には、マイクロウェーブ分解装置 (Ethos Touch Control, Milestone) 及び血液自動前処理装置 (株柴崎製作所製) 測定には、HR-ICP-MS (ELEMENT XR, Thermo scientific) を用いた。BPA 及び BSH を所定量添加したヒト血液試料を対象とし、血液前処理における試料量、添加酸試薬、加熱/冷却時間といった各種条件の最適化を図った。

(2) ホウ素薬剤投与試験

ホウ素薬剤を 10 週齢の Jcl:Wister 系雄ラットに単独又は併用投与し、継時的に採取された血液検体を分別後、うち 1 検体は採血直後、別の検体は採血から 1 時間後、4, 3,000rpm, 5 分間の遠心分離操作により血漿及び血球成分に分離した (日本クレア株)。
BPA 単独投与群 BSH 単独投与群 BPA/BSH

併用投与群 の 3 群に分け、以下条件にて投与を実施した。

BPA 単独投与群 Rat 1: BPA 41mg 投与

BSH 単独投与群 Rat 2: BSH3.5mg 投与

Rat 3: BSH2.1mg 投与

BPA/BSH 併用投与群

Rat 4: BSH1.1mg 投与 (4hr 後) BPA12mg 投与

Rat 5: BSH1.1mg 投与 (4hr 後) BPA12mg 投与

(1) で確立した手法により、ICP-MS を用いた ^{10}B 濃度及び $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ の測定を実施した。

4. 研究成果

(1) 血中 ^{10}B 濃度及び $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ 測定法確立

まずは、既に確立済みである、ICP-MS を用いたホウ素定量法の血液試料への適用性を検証したところ、血液中に含まれるマトリックス元素がホウ素定量上影響を及ぼさないことが確認された。

本研究では、目的や用途に応じて使い分けることが可能な 2 つの手法：マイクロ波試料分解法及び血液自動前処理法を構築した。両手法ともに、ホウ素濃度測定には内標準物質にイットリウムを使用した内標準法、 $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ 測定には、比較標準化法を用いた。

マイクロ波試料分解法

分解容器には、硝酸によるホウ素溶出の可能性が極めて低い、テフロン製又は石英製の容器を使用した。以下、テフロン () 内は石英) 製容器を用いた場合の分解条件を記す。

ヒト全血液試料 0.05g (0.5g) に BPA 又は BSH 溶液を添加後、濃硝酸 0.5mL (5mL) を加えマイクロウェーブ分解装置による処置を施した溶液中の B-10 濃度を測定した結果、ホウ素回収率は BPA、BSH とともに $100 \pm 3\%$ 以内と良好な結果が得られた。

血液自動前処理法

分解容器には、耐熱圧性、更には耐硝酸性を兼備したチタン製の容器を用いた。分析値の信頼性及び迅速性の観点から各種条件の最適化を図った結果、以下条件が最適であることが確認された。血液試料量: 0.05g, 濃硝酸: 3mL, 加熱時間: 2 分, 冷却時間: 3 分

と同様、正確さの評価の為に上述条件下で添加回収試験を実施した結果、回収率は $100 \pm 4\%$ と良好な結果が得られた。さらに、血液検体の分取、分解、溶液化から希釈操作迄の全工程が 10 分 ~ 15 分以上で完了することが確認された。

両手法ともに目的の B-10 を逸失させることなく、加えて確実に分解、溶液化できることが確認された。法は、分析供試量及び試料形態の適用範囲が大きく柔軟性、汎用性に富む一方、法は血液試料の分解に特化した容器を使用する為、迅速性、効率性に優れる、といった特徴を持つ。複数の手法を提案することで、分析精度の担保にも貢献することが期待される。

(2) ホウ素薬剤投与試験

(1) のマイクロ波試料分解法(石英容器使用)により、ラット血液検体中の B-10 濃度測定を行った。

血中 ¹⁰B 濃度
全血中濃度推移

Fig. 1 に各群における全血液及び血漿中 ¹⁰B 濃度推移、並びに ¹⁰B/^{total}B 推移を示す。両薬剤ともに、投与後 30 分以内に最高血中濃度に到達、その後時間経過とともに徐々に減衰し、投与後 3 時間程で血液から消失すると推察される。投与方法、薬剤及び投与量が血中 ¹⁰B 濃度に与える影響を判断するには、条件を変えた更なる検証が必要と考える。

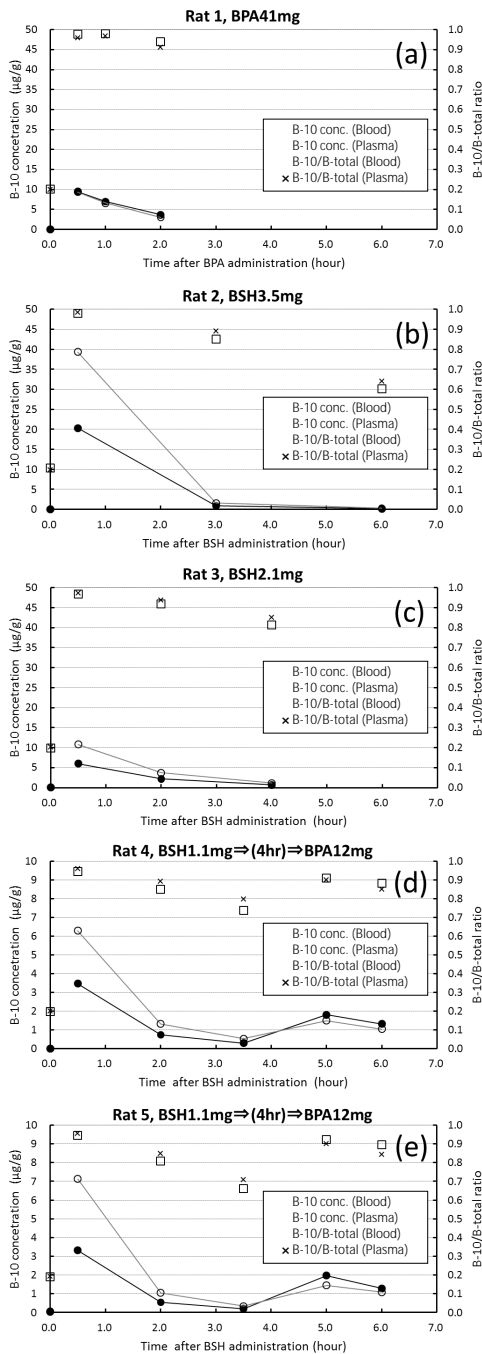


Fig. 1 血中 ¹⁰B 濃度と ¹⁰B/^{total}B の推移

血中における挙動

Fig. 2 に各群における全血/血漿中濃度比 (Rb 値) の推移を示す。BSH の Rb 値は比較的安定である一方、BPA のそれは変動的である。いずれの採血地点においても BSH は 1 以下を示すことから、BSH 由来の ¹⁰B は血球よりも血漿中に多く存在すると考えられる。時間経過に伴う有意な変化は認められなかった。一方、BPA については時間経過とともに血球移行率が上昇する傾向にある。従って、血液に取り込まれた BPA 由来の ¹⁰B の一部が血漿から血球成分へと移行する可能性があるといえる (Laakso et al., 2001)。組織内 ¹⁰B 濃度は血漿中 ¹⁰B (うち血漿タンパクと結合していないもの) の濃度が反映されることから、対象が全血の場合、血漿から血球細胞や組織細胞、細胞間液への薬物移行を考慮した評価が必要となる。

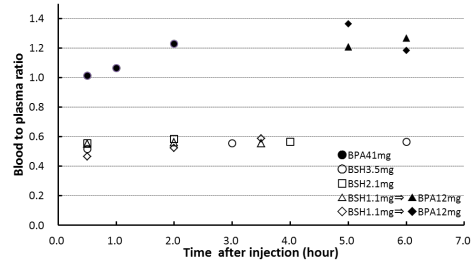


Fig. 2 血中における Rb 値の推移

Fig. 3 に、採血検体の Rb 値の推移を示す。採血から遠心分離までの静置時間が 1 時間の場合、BPA は下降、BSH については上昇・下降傾向が認められた。ただし、遠心分離タイミングが Rb 値に及ぼす影響を判断するには、静置時間、対象数を増やした更なる検証が必要と考える。採血から血漿分離の間に溶血が生じ血球成分から血漿成分へ移行する恐れがあることから、対象が血漿となる場合には、薬物の特性を把握した上、適切な静置時間、静置環境、分離条件等を設定する必要がある。

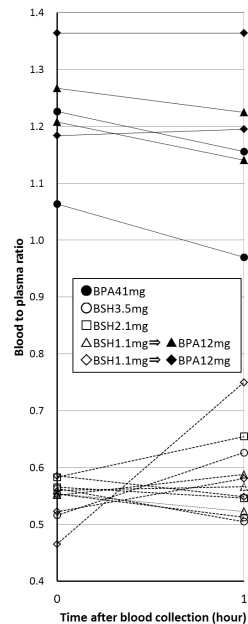


Fig. 3 採血検体の Rb 値の推移

血中 $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ 時間推移

Fig. 1 に示す通り、投与前は天然同位体とほぼ等しい 20%であったが、投与後急上昇し、血液からの薬剤消失とともに低下することが確認された。これは、血液と ^{10}B 濃縮薬剤の同位体組成の相違によるものと考えられる。全血中ホウ素濃度は 14-44 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、血漿中ホウ素濃度は 19-79 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Gouille, J.P. et al., 2005) であり、薬剤投与前は血液中に存在するホウ素の同位体比が反映されるが、ホウ素薬剤投与後、大量のホウ素が血液に取り込まれると、 $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ が急上昇、その後薬剤由来のホウ素濃度の減衰とともに投与前の同位体比に近づく為である。

血中における挙動

BPA 単独群では、血漿と比較し全血中にて高値を示す一方、BSH 単独群ではその逆の傾向を示すことから、BPA は血球、BSH は血漿における ^{10}B 率が高いと予想される。

また、併用投与群においても単独投与と同様の傾向を示した。血液中に BSH 由来 ^{10}B が殆ど存在しない条件下で BPA を投与した場合、単独投与とほぼ等しい同位体挙動を示すと考えられる。単独/併用投与による相違が薬物動態に与える影響を判断するには、併用投与の際の BPA 投与のタイミングを変えた更なる検証が必要となる。

血中 ^{10}B 濃度と $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ の相関

Fig. 4 に示す通り、両者の間に正の相関があることが認められた。 $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ は血中ホウ素濃度とともに、薬剤集積評価における判断材料の一つとして活用できる可能性がある。

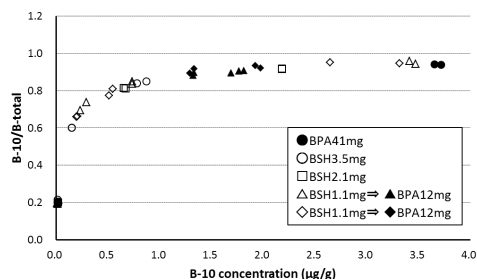


Fig. 4 血中 ^{10}B 濃度と $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ の相関

総括

- ・両薬剤ともに血中分布が一定でないこと、更に両者でその挙動傾向が異なることが確認された。
全血を対象とする場合には、予め両者薬物の移行特性を把握しておく必要がある。
- ・ $^{10}\text{B}/^{\text{total}}\text{B}$ は血中ホウ素濃度とともに、薬剤集積程度を評価する簡易的な指標として活用できる可能性があることがわかった。
- ・投与薬剤、投与量並びに単独/併用投与による相違が薬物動態に与える影響を判断するには、投与条件を変えた更なる検証が必要と考える。

- ・遠心分離のタイミングが血中分布に与える影響を判断するには、検体の静置時間を変えた更なる検証が必要と考える。

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, T. Morimoto, Study of charged particle activation analysis (I): Determination sensitivity for single element samples, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Vol.308, 711-719 (2016)

[学会発表](計6件)

山口友理恵、大島真澄、伴場滋、浅井雅人、塚田和明、佐藤哲也、豊嶋厚史、畢春蕾、天野光、瀬戸博文、森本隆夫、Study of charged particle activation analysis (II): Determination of boron concentration in human blood sample, 東海・重イオン科学シンポジウム タンデム加速器成果報告会、東海村、2017年1月5日~1月6日

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 Boron Neutron Capture Therapy meeting, Sep. 13-17, 2015, Pavia, Italy

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 Boron Neutron Capture Therapy meeting, Sep. 13-17, 2015, Pavia, Italy

山口友理恵、畢春蕾、伴場滋、熊田博明、中井啓、山口耕生、森本隆夫、BNCTにおける血中ホウ素同位体比測定法の確立に向けて、第11回茨城地区分析技術交流会(日本分析化学会関東支部)、いばらき量子ビーム研究センター、東海村、2014年12月5日

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

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

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：生体試料の分解容器及び前処理装置
発明者：松江登久、森本隆夫、伴場滋、畢春
蕾、瀬戸博文、山口友理恵、熊田博明
権利者：柴崎製作所、日本分析センター、筑
波大学
種類：特許
番号：特願 2015-179618
取得年月日：2015 年 9 月 11 日
国内外の別： 国内

6．研究組織

(1)研究代表者

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