

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（分担）（総合）研究報告書

初発膠芽腫に対する新規放射線化学療法による有効治療法確立のための臨床研究
研究分担者 切畑 光統 大阪府立大学 21 世紀科学研究機構・特認教授

研究要旨

膠芽腫の BNCT 臨床に実用されている 2 つの硼素化合物、BPA 及び BSH の機器分析法及び免疫細胞化学的分析法に関して、原体の医薬品品質を検証・保証・分析する方法を確立した。また、抗 BPA 及び抗 BSH モノクローナル抗体を開発し、免疫細胞化学的手法による両硼素化合物の細胞分布の解析法を確立した。更に、高純度品の効率的な精製法、非臨床試験に関わる原体や薬液の安全な保存方法を開発した。

A. 研究目的

GMP品質硼素化合物の純度分析及び細胞内分布の確認法の開発、精製法の開発と非臨床試験に関わる安定性試験

B. 研究方法

膠芽腫BNCTに臨床実用されている 2 つの硼素化合物、*p*-boronophenylalanine (BPA) 及び disodium undecahydrododecaborate (BSH)を対象に、機器分析法及び免疫細胞化学分析法を確立した。薬剤原体や薬液の純度分析、不純物分析には、前者の方法を採用し、細胞内分布等の分析には後者の方法を採用する。また、これらの分析法を活用して高品質の精製法、保存法、類縁硼素薬剤の細胞内分布評価について検討する。

1) BPA及びBSH の機器分析

純度及び不純物測定を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)/質量分析、ICP(イオンプラズマ発光)分析を用いて行い、構造は核磁気共鳴(NMR)分析で確認する。

2) 免疫細胞化学分析法

別途、抗BPA及び抗BSHモノクローナル抗体を作製、培養がん細胞を用いてin vitroでのミクロ分布を分析する。

3) BPA、BSHの効率的精製法

無酸素、脱気純水を用いた再結晶化によるBPAの効率的な精製法を確立する。また、カチオン変換後のイオン交換樹脂カラムによるBSHの精製法についても検討する。

4) BPA、BSHの安定性評価と保存法の確立

固体(粉状)として供給されるBPA、BSH原体の外的物理要因(光、温度、酸素)に対する安定性、及び水溶液中の安定性を1)で得られた成果を基に評価する。また、外的要因により副生する不純物の生成機構と構造を推定し、最適保存法を確

立する。

C. 研究結果

1) BPA及びBSH の機器分析

BPAは、逆相HPLC/MSによるクロマト分析が効果的であった。BSHのHPLC分析も同様に可能であるが、精度の高い分析を行うには更なる検討が必要である。NMR分析、ICP分析による構造確認法も達成された。

2) 免疫細胞化学分析法

抗BPA及び抗BSHモノクローナル抗体を用いて、培養がん細胞におけるBPA及びBSHの細胞内ミクロ分布を可視化、画像化して解析・評価した。BPAは細胞質、核内に広く分布することが確認されたが、BSHでは鮮明な画像は得られず、分布を特定できなかった。

3) BPA、BSHの効率的精製法

沸騰直前の無酸素純水によるBPAの効率的な再結晶化精製に成功した。これにより品質の劣る粗BPAの精製が可能となった。

一方、BSH・2Na精製では、Naイオンを低水溶性のアンモニウム型に変換して精製した後、イオン交換樹脂カラムで再びナトリウム塩に変換する方法が最も効果的であった。

4) BPA、BSHの安定性評価と保存法の確立

固体粉末状のBPA、BSHは、比較的安定な化合物であるが、長期保存には無酸素下、低水分、低温、遮光の諸条件が必要であった。特に無酸素の条件が重要であった。中性領域の水溶液において、BPAはジヒドロキシボリル基が緩やかに加水分解され、ホウ酸、フェニルアラニン、チロシンが生じた。この反応は酸素存在下で加速された。一方、BSH水溶液では、酸素存在下でイオウ原子の酸化反応が起こり、2量体や

スルホンなどの酸化物の存在が推定された。

これらの事から、固体及び溶液の最適保存方法が提唱できた。

D . 結果およびE . 考察

1) BPA及びBSH の機器分析

BPA は3つの極性な官能基を持つ難水溶性の化合物であり、UV吸収を持つことから、逆相HPLC分析による純度分析が適していた。

一方、BSHはイオン性の無機化合物であり、UV吸収は非常に弱く検知が困難で、適切なHPLC分析法は報告されていない。今後、超高压HPLC分析法については検討課題である。

2) 免疫細胞化学分析法

BNCTにおけるBPAの高い殺細胞効果は、BPAが核内に存在することが一因であるとされてきたが、本研究においても核内分布が改めて確認された。BSHは水溶性が高く、染色過程での流出や移動が予測され、この方法によるミクロ分布の確定は困難と考えられる。

この染色法は、短時間でホウ素薬剤分布を検知できることから、水溶性の低いBPAやBSH誘導体の検出に適していて、新規硼素薬剤開発のスクリーニング等において活用されている。

3) BPA、BSHの効率的精製法

本研究で開発されたBPA、BSHの簡便で効果的な精製法は、原体の再生に有効で、分析用高純度標品の入手が可能となった。また、種々の誘導体精製にもこの方法が、応用され有効であった。

4) BPA、BSH の安定性評価と保存法の確立

本研究により、両硼素化合物の安定性とこれに影響する外的要因が評価され、副生する不純物の構造が判明し、安全な保管方法が確立された。これらの結果は、今後、硼素薬剤保管や薬剤管理のガイドライン作製に役立つと期待される。

F . 健康危険情報

研究代表者による総合研究報告書参照

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Synthesis of optically active dodecaborate-containing L-amino acids for BNCT, *Applied Radiation & Isotopes*, **69** (2011) 1768-1770.

- 2) A Novel Modification Method of Peptides and Proteins by Anionic Dodecaborate Cage in Water, *Peptide Science* 2010 (2011) 105-108.

- 3) Dodecaborated-Containing L-Amino Acids as New Boron Carriers for Boron Neutron Capture Therapy, *Peptide Science* 2011 (2012) 19-22.

- 4) Biological Evaluation of Dodecaborate-Containing L- Amino Acids for Boron Neutron Capture Therapy, *J. Med. Chem.*, **55** (2012) 6980-6984.

- 5) Synthesis and Evaluation of Thiododecaborated □□□-Cycloalkyl Amino Acid for Boron Neutron Capture Therapy, *Peptide Science* 2012 (2013) 85-87.

2. 学会発表

- 1) 負イオンホウ素クラスター含有アミノ酸の短段階合成法とBNCT用ホウ素薬剤としての評価, 日本化学会第92春季年会, 2012 (神奈川)

- 2) Synthesis and Evaluation of Thio-dodecaborated □□□□-Cycloalkyl Amino Acids for Boron Neutron Capture Therapy, 第49回日本ペプチド学会, 2012 (鹿児島)

- 3) ドデカボレート含有アミノ酸の *in vitro* における生理活性評価, 第10回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2013 (岡山)

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし