

博士学位論文

Paclitaxel による末梢神経障害重篤化の リスク因子解析及び基礎的研究

平成25年度
昭和薬科大学
川上和宜

目次

	項
序論	1
本論	
第1章 Paclitaxelによる末梢神経障害重篤化のリスク因子解析	
1. 諸言	3
2. 対象及び方法	6
3. 結果	11
4. 考察	19
第2章 Paclitaxelの末梢神経障害作用メカニズムの基礎的研究	
1. 諸言	23
2. 実験材料及び実験方法	25
3. 結果	30
4. 考察	36
結論	39
引用文献	42
謝辞	48

序 論

わが国においてがんは死亡率第1位であり、2009年にがんで死亡した人は約34万人と報告されている¹⁾。近年、がん克服のため多くの抗がん剤が開発され臨床現場で使用できるようになってきた。抗がん剤を適切に使用するためには、副作用をコントロールし抗がん剤の投与量を保つことが重要である。抗がん剤には多種多様な副作用があり副作用コントロールが難しい場合がある。抗がん剤の副作用は主に骨髄抑制、悪心・嘔吐等であるが、それぞれ支持療法薬として、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 製剤やセロトニン (5-HT₃) 受容体拮抗薬、NK-1 受容体拮抗薬であるアプレピタントなどが開発され、ガイドラインも整備されてきている。

現在、臨床現場では末梢神経障害、手足症候群、皮膚症状や味覚異常などの非血液毒性と言われる副作用が課題となっており、その要因として評価が難しいことや有効な支持療法薬がないことが考えられる。よって支持療法薬のガイドラインも未整備で、抗がん剤の効果はあっても、抗がん剤の減量や中止をせざるをえない状況である。特に、末梢神経障害は重篤化しても表面上変化がなく、重篤度の評価が難しい。また、患者の Quality of life (QOL) を大きく低下させる副作用のひとつであり、臨床現場で対応に苦慮することが多い。

末梢神経障害の症状は、症候学的分類では、感覚神経障害、運動神経障害、自律神経障害に分類される。感覚神経障害は、感覚の鈍麻から異常感覚が種々の程度に混在したかたちで現れ、手袋や靴下を履いているような部分に神経障害が分布し、末梢にいくほど症状が強くなるのが特徴である。さらに感覚神経障害の表現型として、感覚鈍麻 (hypesthesia)、異常感覚 (dysesthesia、paresthesia)、感覚脱出 (anesthesia)、感覚過敏 (hyperesthesia、allodynia) に分類される²⁾。患者

からの訴えとしては、「手足がピリピリする、手先に一枚紙が貼り付いている感じがする」などである。運動神経障害は、感覚障害に加えて、四肢遠位部優位の筋萎縮と筋力低下、弛緩性麻痺を呈する。末梢神経障害が重篤化した場合には、「ボタンをはめにくい、薬をシートから出しにくい」など日常生活に影響を及ぼすような機能障害を引き起こす。自律神経障害は、血圧や腸管運動、不随意筋に障害が発生し、排尿障害や発汗異常、起立性低血圧、便秘などがみられることがあるが頻度は少ない。

末梢神経障害を誘発する抗がん剤として、Paclitaxel や Oxaliplatin、Bortezomib 等があげられる。その中で Paclitaxel は非小細胞肺癌、乳がん、卵巣がん、子宮体がん、胃がん、原発不明がんに対し、標準療法のひとつとして広く用いられている薬剤である。Paclitaxel はタキサン系の抗がん剤であり、作用機序は微小管の蛋白重合を促進し、微小管の安定化・過剰形成を引き起こすことによって微小管の脱重合を起こりにくくし、細胞分裂を阻害して抗腫瘍活性を示す³⁾。

Paclitaxel の末梢神経障害の特徴としては、混合性で感覚・運動神経障害をきたし、両側性に出現し、用量依存的に症状が発現することが知られている。Paclitaxel の血中濃度が 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 以上の持続時間と、末梢神経障害の発現リスクが相関することが示唆されている⁴⁾。投与間隔が 3 週間の場合は 1 回投与量が 175 mg/m^2 以上、毎週投与の場合は 100 mg/m^2 以上で発症リスクが高まる。

Paclitaxel による末梢神経障害の発生機序としては、末梢神経の軸索において微小管の重合が阻害され、それにより軸索の変性と軸索内での微小管の濃度低下が起こり、軸索輸送の阻害による神経機能の低下によって発症すると考えられている⁵⁾。しかし、軸索輸送の阻害以外にも、Paclitaxel の投与による血流低下が感覚障害の誘発に関与しているという報告⁶⁾や、脊髄後根神経節での Schwann

細胞の増加、CD68 陽性活性化マクロファージの増加が観察されており⁷⁾、詳細な発生機序は不明である。

そこで、本研究では、現在臨床現場で有効な対処方法が存在しない Paclitaxel の末梢神経障害に対して、末梢神経障害の重篤化を回避するため、そのリスク因子を明らかにすることとした。さらに、末梢神経障害の発現メカニズムを検討し、末梢神経障害に対する治療薬の可能性について検討を行った。

本 論

第 1 章 Paclitaxel + Carboplatin 療法における末梢神経障害重篤化の 発現リスクに関する研究

緒 言

わが国において、肺がんが原因となった死亡者数は年間約 6 万 8 千人であり、がんの部位別死亡率は男性 1 位、女性 2 位であり、全体の約 20%を占めている。肺がんは病理診断により小細胞がん、肺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、その他に分類され、小細胞がんと非小細胞がんが大きく治療方針は異なる。肺がんの約 85%を占める非小細胞がんは、増殖速度が遅く抗がん剤や放射線に対し低感受性であったが、1980 年代に Cisplatin が開発され、その後、各種抗がん剤の有用性が示されてきた。Etoposide や Vindesine 等と Cisplatin の 2 剤併用療法は、best supportive care と比較し有意に生存期間を延長させるということが、いくつかのメタアナリシスにより報告されている⁸⁾。さらに QOL も改善させるという臨床試験の結果も報告されており^{9, 10)}、がん化学療法は延命・症状緩和を目的として行われるようになった。

その後、新規抗がん剤として Paclitaxel、Docetaxel、Irinotecan、Gemcitabine、Pemetrexed が使用されるようになり、Cisplatin や Carboplatin との併用療法は今日の標準療法のひとつとなっている。日本で行われた第 III 相臨床試験である FACS study では、Paclitaxel + Carboplatin、Cisplatin + Gemcitabine、Cisplatin + Irinotecan、Cisplatin + Vinorelbine の 4 群において、治療効果に差は認められないこと及び、毒性のプロファイルが異なることが報告された¹¹⁾ (Fig. 1)。この中で Paclitaxel + Carboplatin は、Cisplatin 併用レジメンと比較して水分負荷の必要

性がないため、点滴時間が短く腎毒性や消化器毒性が軽度であり、臨床で多く使用されるレジメンのひとつとなった。

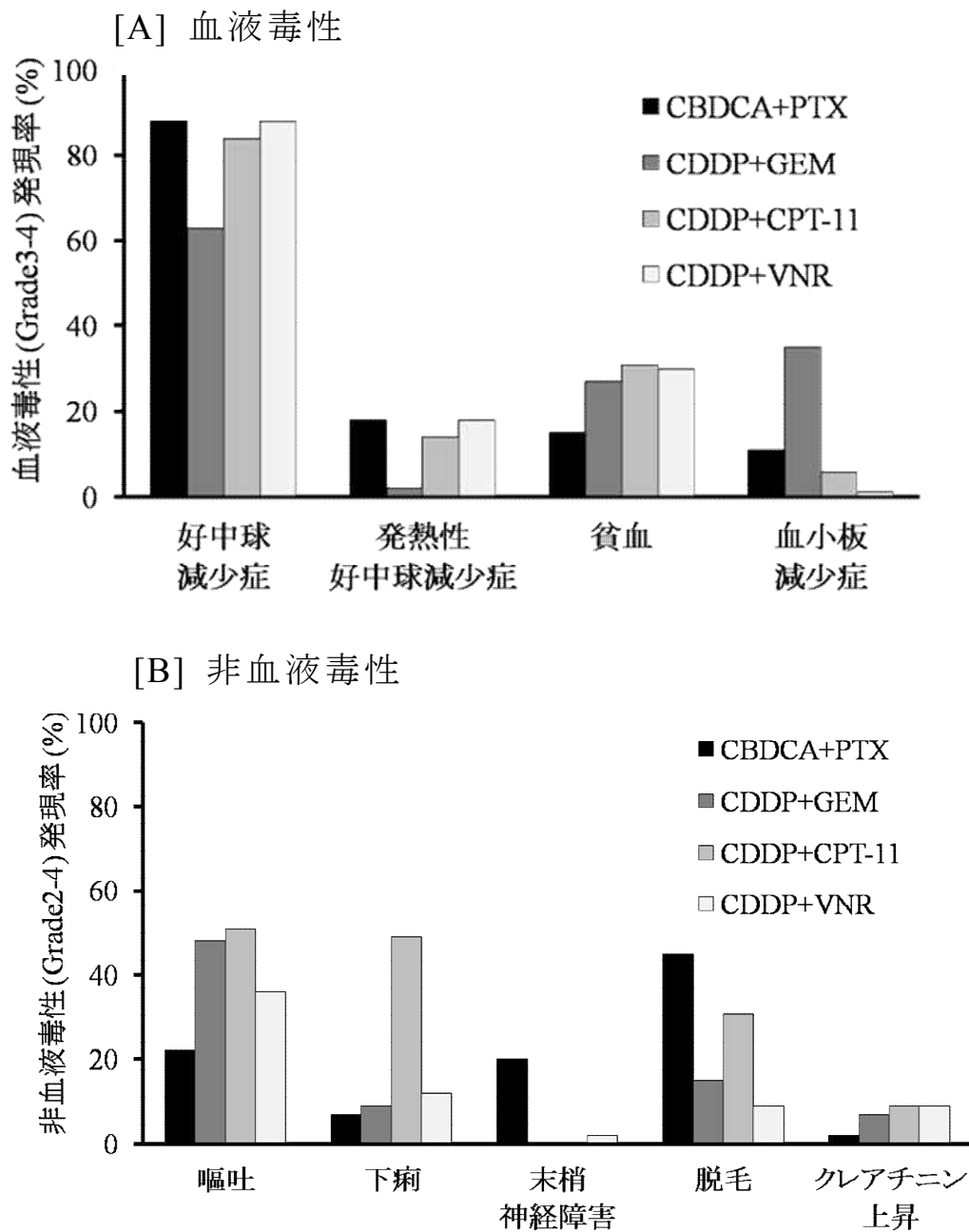


Fig. 1 FACS study における各レジメンの毒性比較 (文献 10) より引用、一部改変

Paclitaxel + Carboplatin 療法における用量規定因子としては、Paclitaxel 及び Carboplatin による好中球減少、血小板減少のような骨髄抑制や、Paclitaxel による末梢神経障害がある。骨髄抑制は高率に発現し、重篤化すると感染や出血のり

スクが増大するが、G-CSF 製剤の使用や血小板輸血といった対処法がある。その一方で、末梢神経障害も高率に発現し、重篤化するほど QOL や activity of daily (ADL) は低下し¹²⁾、患者によっては治療継続が困難となる場合がある。また、重篤化するほど回復に長い期間を要することが報告されている¹³⁾。そのため末梢神経障害に対して様々な予防法、治療法について検討が行われているが、未だ第 III 相臨床試験^{14, 15)}での効果の証明された予防法、治療法がないため問題となっている¹⁶⁾。重篤な副作用発現回避のために、副作用発現や増悪リスク因子についての検討も行われており、Paclitaxel による末梢神経障害発現のリスク因子に関しては、Paclitaxel の蓄積性を示唆した報告がされている他に、70 歳以上の高齢者で末梢神経障害の発現率が高かったという報告や¹⁷⁾、糖尿病の合併がリスクとなるという報告がある¹⁸⁾。しかし、Paclitaxel の蓄積と、これらのリスク因子との関連性は明らかとなっていない。

そこで本研究では、Paclitaxel の蓄積性を確認したうえで、それを加味した解析を行い、リスク因子を検討した。末梢神経障害の評価は難しいとされているが、がん研有明病院薬剤部では National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) version 3.0 による評価基準に基づいた質問項目を定め、その質問項目に従って薬剤師が末梢神経障害の重篤度評価を行っている。本研究で得られたデータにより、末梢神経障害の発現時期や頻度、特徴を明らかにできると考えられる。

これらの調査及び検討を行い、末梢神経障害重篤化のリスク因子を明らかにすることは、薬剤師が薬剤管理指導の中で服薬指導を行う際に必要な末梢神経障害についての情報に加えて、患者個々に最適な治療を選択するうえで必要な情報のひとつとなると考えられる。

対象及び方法

1. 対象患者

2009年5月20日から2010年11月30日の間、がん研有明病院呼吸器内科にて、非小細胞肺癌に対する1次治療として Paclitaxel+Carboplatin (± Bevacizumab) 療法を開始した患者を対象とした。

2. 調査項目

カルテ上の診療録及び薬剤管理指導記録より、以下の各項目について調査した。

1) 患者背景

治療開始前における性別、年齢、組織型、臨床病期、performance status (PS)、body-mass index (BMI)、body surface area (BSA)、喫煙指数 (本/日×年)、合併症、転移部位、Bevacizumab 併用の有無、併用薬、放射線治療先行の有無について調査した。

2) 治療遂行状況

各治療コースにおける Paclitaxel 投与量及び期間、治療コース数、治療中止・減量投与の有無及びその原因、末梢神経障害治療を目的とした薬剤の新規処方について調査した。

3) 末梢神経障害発現状況

各コース治療期間内において、発現した末梢神経障害が最も重篤であった Grade (末梢神経障害発現 Grade の最悪値) を、該当コースにおける末梢神経障害の Grade とした。末梢神経障害の評価は、Table 1 の末梢神経障害の評

なお、Scrよりクレアチニンクリアランス（Ccr）を、Cockcroft-Gault式を用い算出した。

3. 末梢神経障害発現状況の調査スケジュール

非小細胞がんに対する Paclitaxel + Carboplatin（± Bevacizumab）療法における治療レジメンを Table 2 に示す。

1 コース目については、副作用のプロファイルを確認するために 14 日間以上入院するが、2 コース目以降では短期入院で治療を継続する。末梢神経障害のモニタリングは、患者の治療スケジュールに合わせて、入院期間中は毎日実施した。

① 1 コース目における末梢神経障害発現状況

抗がん剤投与 1 日目－14 日目（患者入院期間）までの連日の発現状況を調査した。また、15 日目－21 日目の評価については、21 日目（2 コース目の治療目的のための入院時）において評価したものを調査した。

② 2 コース目以降の末梢神経障害発現状況

抗がん剤投与 1－3 日目までの連日の評価を調査した。また 4 日目－21 日目の評価については、21 日目（次コース治療目的のための入院時）において評価したものを調査した。なお、治療終了後や治療中止後については、外来にて評価したものを調査した。

Table 2 Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法のレジメン

薬剤名	投与方法	投与時間	1日目
デキサメタゾン 16.5 mg ゲラニセロン 3 mg 生理食塩液 100 mL	点滴静注	0.5 時間	○
ジフェンヒドラミン錠 50 mg	内服		○
Paclitaxel 200 - 210 mg/m ² 5%ブドウ糖液 500 mL	点滴静注	3 時間	○
Carboplatin AUC=6 生理食塩液 250 mL	点滴静注	1.5 時間	○
Bevacizumab 15 mg/kg 生理食塩液 100 mL	点滴静注	1.5 時間†	○

†:初回のみ、問題がなければ以降 1 時間から 30 分へと短縮

4. 統計解析

有意水準は、両側検定で 5%とし、全ての統計解析は PASW Statics 18.0 (SPSS Japan Inc.) を使用した。

1) 末梢神経障害の蓄積性

治療遂行状況及び末梢神経障害の発現状況より、各患者における各末梢神経障害の重篤度 (Grade 評価) 及びその発現コースまでの Paclitaxel 累積投与量を算出した。そして、各 Paclitaxel 累積投与量時点における累積末梢神経障害発現患者割合を Kaplan-Meier 法を用いて算出した。これを各末梢神経障害の重篤度 (Grade) について行い (Grade 1 以上、Grade 2 以上、Grade 3)、Paclitaxel 累積投与量と累積末梢神経障害発現患者割合の関係を確認した。

2) 末梢神経障害重篤化のリスク因子解析

①末梢神経障害重篤度による分類

各患者を治療期間中における末梢神経障害発現重篤度 (Grade) の最悪値により分類した。また、日常生活に支障をきたし治療中止も考慮しなくてはならない Grade 3 を末梢神経障害の重篤化群とし、Grade 2 以下あるいは発現

のなかった場合を非重篤化群とした。

②末梢神経障害重篤化との関連性の解析

各因子の末梢神経障害重篤化との関連を解析するために、患者背景及び1コース目治療開始前直近の血液生化学的検査値について、末梢神経障害重篤化群と非重篤化群の2群間比較を後述の各単変量解析にて行った。

連続及び順序尺度の因子については、予め分布及び分散を確認し、Student または Welch の t 検定、あるいは Mann-Whitney の U 検定を行った。各名義尺度の因子については、Fisher の正確確率検定を行った。

また、併用薬に関しては、末梢神経障害に適応のあるビタミン B₁₂ 製剤の使用（治療開始時より併用していた患者及び治療）を両群で比較した。また、治療期間中に末梢神経障害の治療を目的として新規処方なされた薬剤の使用についても比較した。加えて、各患者における1コース平均期間を両群で比較した。

③末梢神経障害重篤化のリスク因子解析

末梢神経障害重篤化のリスク因子を明らかにするために、比例ハザードモデルによる解析を行った。

従属変数は末梢神経障害重篤化とした。そして単変量解析にて有意差が認められた因子を独立変数とした。

因子の選択は、変数増加法（投入：0.05、除去：0.10）により行った。なお、事前に独立変数間の相関関係を Pearson の積率相関係数及び Spearman の順位相関係数により確認し、 $|r| \geq 0.7$ の相関がないことを確認した。

④末梢神経障害重篤化リスク因子の治療による変化

多変量解析にて末梢神経障害重篤化のリスク因子として示唆されたもの

のうち、治療期間中に治療による影響により変化する可能性の因子（血液生化学的検査値）について、末梢神経障害重篤化群における変化を確認した。

結 果

1. 対象患者

対象患者の患者背景を Table 3 に示す。Paclitaxel + Carboplatin 療法が実施された患者は 45 名、Paclitaxel + Carboplatin + Bevacizumab 療法が実施された患者は 5 名であった。非小細胞肺がんの一般的な患者背景と同様であった。治療開始前よりビタミン B₁₂ 製剤を服用していた患者は認められなかった。

Table 3 患者背景

対象患者	50 (名)
性別 (男 / 女)	36 / 14
年齢 †	68.5 (41-78)
組織型 (腺 / 扁平上皮 / 大細胞 / その他※)	27 / 13 / 4 / 6
臨床病期 (II / III / IV)	1 / 18 / 31
Performance status (0 / 1 / 2 / 3)	31 / 15 / 3 / 1
Bevacizumab の併用 (なし / あり)	45 / 5

†: median (range)

※大細胞神経内分泌がん、混合型、不明

2. 治療完遂状況

対象患者 50 名の治療遂行状況と、治療中止及び抗がん剤減量となった理由について Fig. 3 に示す。

各コースで減量投与や治療中止が認められた。抗がん剤減量後、投与量を元に戻した患者は認められなかった。13 名が減量投与を行ったが、その原因

としては用量規定因子である骨髄抑制によるものが11名(22.0%)であった。一方で、22名が治療中止となり、その理由としては現病進行によるものが12名(24.0%)、用量規定因子である末梢神経障害によるものが6名(12.0%)に認められた。1コース終了後、自宅で転倒したことによるくも膜下出血で死亡した患者の末梢神経障害はGrade 2であったが、退院日までには回復しており、転倒との因果関係は不明であった。

末梢神経障害が原因で治療を中止した患者6名のうち、4名はGrade 3で中止となっており、Grade 2及びGrade 1で治療中止となった患者は1名ずつであった。なお、治療の完遂率は56.0%であり、治療の1コース平均期間は25.3日であった。

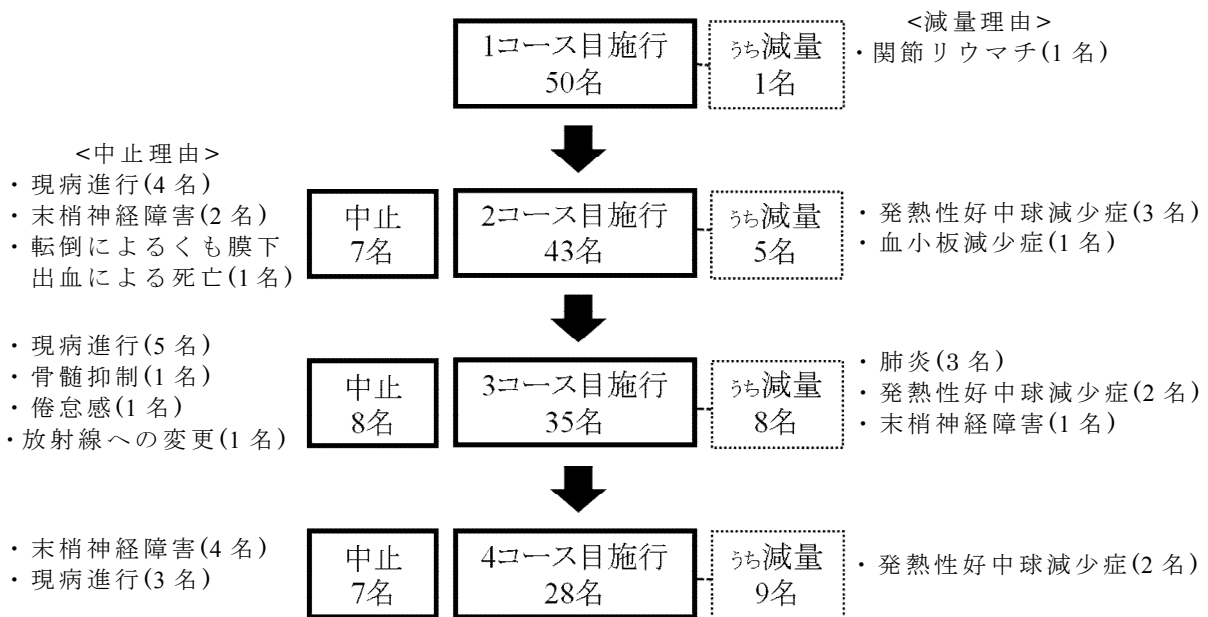


Fig. 3 治療遂行状況と治療中止、減量理由

3. 末梢神経障害発現状況

1) 1コース目における末梢神経障害発現状況

1コース目における末梢神経障害の発現時期や経過を確認するために、連日副作用モニタリングを行った。1コース目の抗がん剤投与14日目までの末梢神経障害発現状況を Fig. 4 に示す。

末梢神経障害は、抗がん剤投与3日目より発現した患者が17名と最も多く、5日目までの間に50名中38名(76.0%)に発現した。また、末梢神経障害発現後はGradeの経時的回復や増悪が認められた患者もいたが、2コース目の治療開始時まで末梢神経障害が持続した患者は、1コース目に末梢神経障害を発現した患者43名中38名(88.4%)であった。なお、14日目以降に末梢神経障害を発現した患者は2名であった。

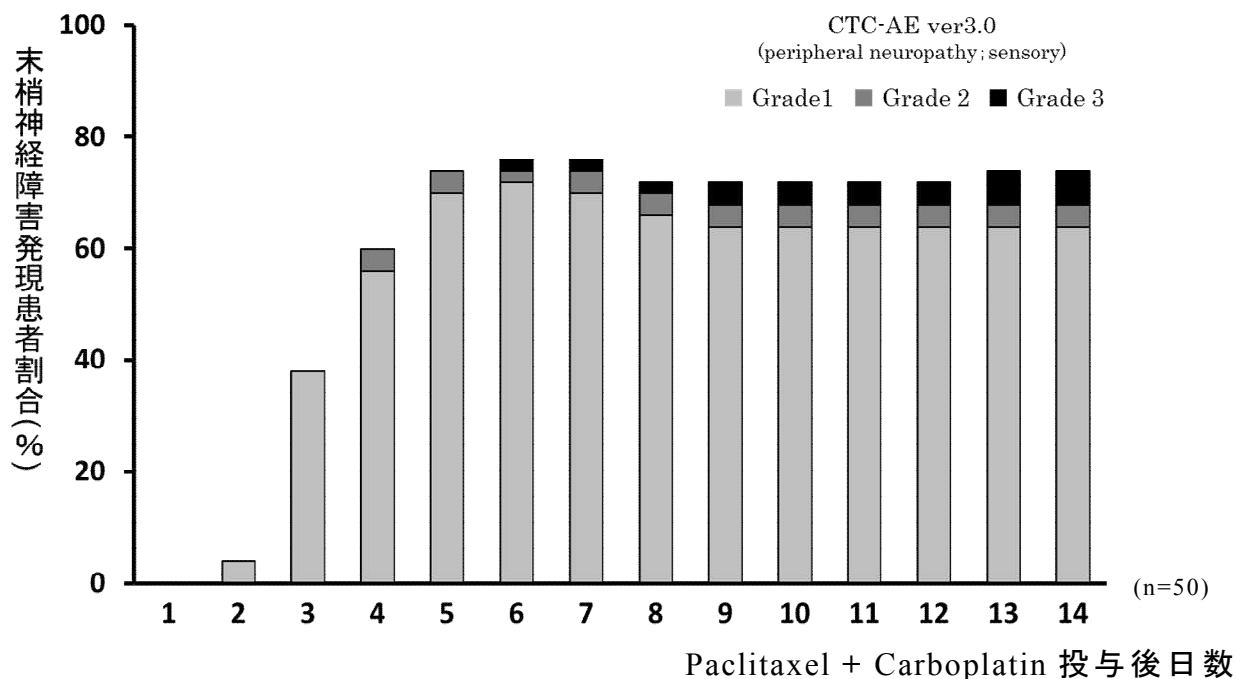


Fig. 4 1コース目における末梢神経障害発現状況

2) 末梢神経障害の推移状況

末梢神経障害発現の推移を明らかにするために、各コース内の末梢神経障

害発現の重篤度（Grade）を調査したものを Fig. 5 に示す。

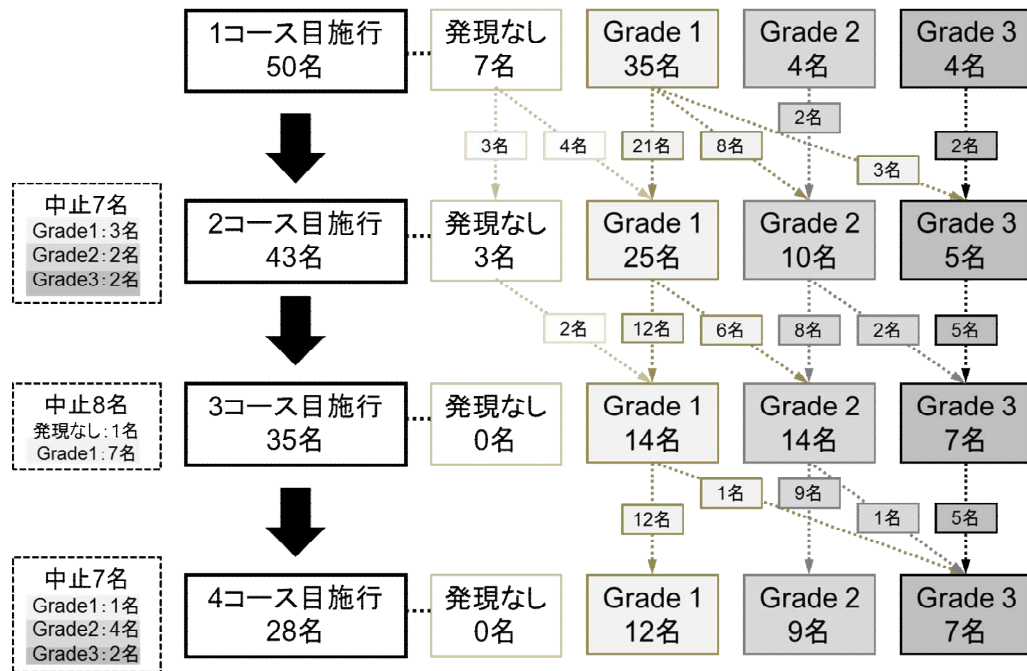


Fig. 5 投与コースごとの末梢神経障害推移状況

治療 1 コース目において 43 名 (86.0%) に、2 コース目では 40 名 (93.0%) の患者に末梢神経障害の発現が認められた。さらに、3 コース目以降では全ての患者に末梢神経障害が認められた。また、末梢神経障害はコースを重ねると重篤化する傾向であった。

Paclitaxel の減量を行った患者 13 名における減量投与後の末梢神経障害の推移については、増悪が 5 名、不変は 8 名であった。増悪した 5 名のうち 2 名は Grade 3 へ増悪していた。

4. 末梢神経障害の蓄積性

Paclitaxel の累積投与量と累積末梢神経障害発現患者割合の関係を、Kaplan-Meier 法にて検討した (Fig. 6)。

Grade 1 以上の末梢神経障害は、210 mg/m² 以上の投与により 80%以上の患

者に発現し、630 mg/m²以上の投与により全例に末梢神経障害の発現が認められた。また、Grade 2以上の末梢神経障害は、630 mg/m²の投与により50%以上の患者に発現が認められた。Grade 3の末梢神経障害については、200 mg/m²の投与より発現し、Paclitaxel 累積投与量の増加と共に累積末梢神経障害発現患者割合の増加や増悪が認められた。

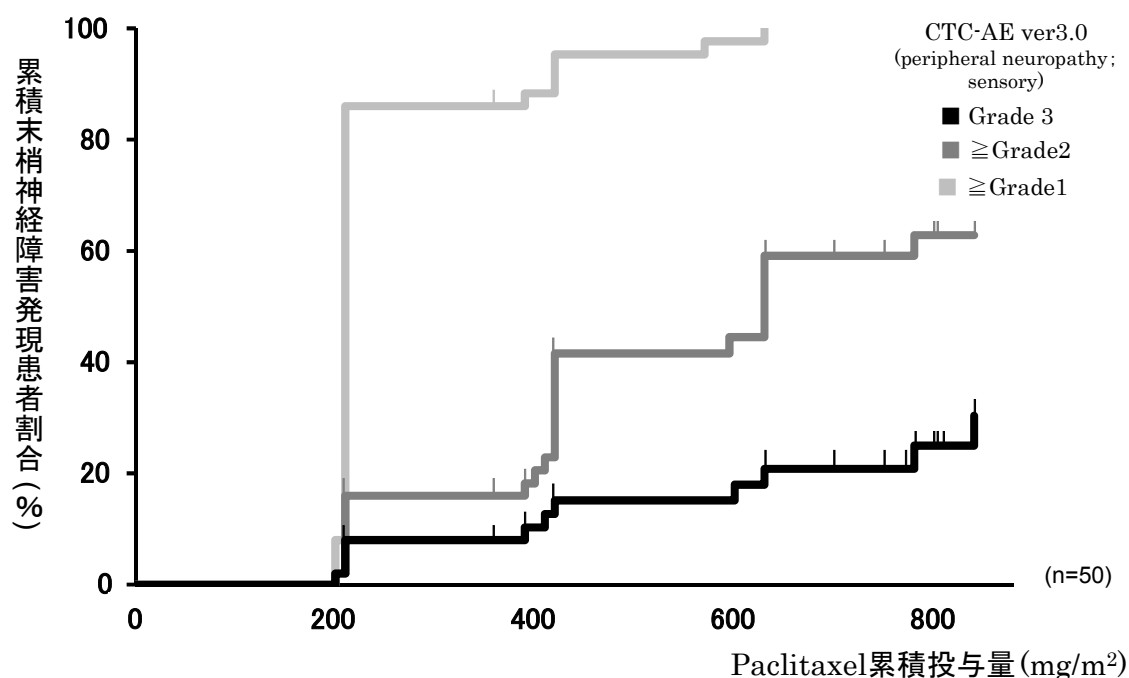


Fig. 6 Paclitaxel 累積投与量と累積末梢神経障害発現患者割合

5. 末梢神経障害重篤化リスク因子解析

1) 末梢神経障害重篤度による分類

対象患者の治療コース数及び末梢神経障害発現重篤度（Grade）についてまとめたものを Table 4 に示す。Grade 3であった患者を重篤化群、Grade 2以下の発現あるいは発現の無かった患者を非重篤化群とした。

今回対象となった患者の末梢神経障害発現率は発現なし：1名（2%）、Grade 1：23名（46%）、Grade 2：15名（30%）、Grade 3：11名（22%）であった。

Table 4 対象患者の投与コース数と末梢神経障害発現重篤度

治療 コース数	非重篤化群			重篤化群
	発現なし	Grade1	Grade2	Grade3
1コース	0	3	2	2
2コース	1	7	0	0
3コース	0	1	4	2
4コース	0	12	9	7
計 (n)	1	23	15	11

2) 末梢神経障害重篤化との関連性の解析

末梢神経障害重篤化と非重篤化の、患者背景や1コース目治療開始前直近の血液生化学的検査値について、各因子に合わせた検定を行った結果をTable 5に示す。

末梢神経障害非重篤化群と比較すると、重篤化群においては喫煙指数が有意に高く、クレアチニンクリアランスが有意に低かった。その他の因子については、2群間に有意差は認められなかった。これら単変量解析にて有意差のあった因子を、多変量解析を行う際の独立変数とした。

なお、治療開始時より末梢神経障害に適応のあるビタミン B₁₂ 製剤を服用していた患者は、両群共に認められず、末梢神経障害発現後にビタミン B₁₂ 製剤が開始となった患者は、重篤化群、非重篤化群に1名ずつであった。また、1コース平均期間を比較したが、両群間に差は認められなかった（重篤化群 vs 非重篤化群 = 26.5日 vs 24.8日、 $p = 0.188$; Mann-Whitney の U 検定）。

Table 5 患者背景及び1コース目治療開始前の血液生化学的検査値の単変量解析結果

	重篤化群(n=11) [Grade3]	非重篤化群(n=39) [Grade2≥]	p値
性別(男/女)	9/2	27/12	0.341 [*]
年齢(歳)†	68(63-72)	68(41-78)	0.689
組織型 (腺/扁平上皮/大細胞/他)	6/2/1/2	21/11/3/4	0.860
病期 (2/3/4/術後再発)	0/4/7/0	1/14/20/4	0.751
PS(0/1/2/3)	6/4/0/1	25/11/3/0	0.376
BMI(kg/m ²)†	20.2(17.3-28.5)	21.9(17.9-27.7)	0.343
BSA(m ²)†	1.54±0.16	1.61±0.17	0.473
喫煙指数(本/日×年)†	1500(0-2550)	660(0-2040)	0.006
糖尿病の合併(あり/なし)	2/9	7/32	0.645 [*]
脳転移(あり/なし)	1/10	7/32	0.430 [*]
骨転移(あり/なし)	3/8	9/30	0.528 [*]
Bvの併用(あり/なし)	3/8	2/37	0.064 [*]
WBC(10 ³ /μL)†	7.6(5.4-12.1)	7.9(2.8-25.8)	0.673
RBC(10 ⁶ /μL)†	4.06±0.54	4.11±0.43	0.745
Hb(g/dL)†	12.44±1.63	12.54±1.25	0.824
Hct(%)†	37.3±4.6	37.2±3.6	0.975
PLT(10 ³ /μL)†	250(187-538)	296(151-488)	0.734
Neu(10 ³ /μL)†	4.84(2.92-7.96)	5.42(1.67-22.32)	0.412
T-Bil(mg/dL)†	0.52±0.19	0.51±0.19	0.935
ALP(IU/L)†	251(160-398)	262(157-1348)	0.558
LDH(IU/L)†	207(181-264)	202(142-873)	0.673
AST(IU/L)†	21(15-33)	19(11-42)	0.130
ALT(IU/L)†	17(8-30)	18(7-63)	0.707
BUN(mg/dL)†	17(9-28)	14(5-34)	0.180
Ccr(mL/min)†	63.9(38.1-84.1)	73.9(43.2-175.9)	0.025
補正Ca(mg/dL)†	9.1(8.8-9.8)	9.1(8.5-10.8)	0.845
Na(mEq/L)†	138.3±5.1	138.9±3.4	0.646
K(mEq/L)†	4.2(3.7-4.9)	4.4(3.7-5.7)	0.991
Cl(mEq/L)†	105(88-106)	104(93-109)	0.723
Alb(g/dL)†	3.8(2.5-4.4)	3.8(1.8-4.5)	0.823
CRP(mg/dL)†	0.46(0.1-7.36)	1.3(0.06-22.07)	0.681

Bv: Bevacizumab †: median (range) ‡: mean ± S.D. *: one-sided

3) 末梢神経障害重篤化のリスク因子解析

比例ハザードモデルにて、末梢神経障害重篤化のリスク因子解析を行った結果を Table 6 に示す。その結果、クレアチニンクリアランスの調整ハザード比が 0.945、95%信頼区間[0.904-0.988]、p 値が 0.013、喫煙指数は調整ハザ

ード比が 1.140、95%信頼区間[1.027-1.265]、 p 値が 0.014 であった。2 項目とも $p < 0.05$ と有意であり、モデル χ^2 検定は $p < 0.001$ で有意であった。

Table 6 比例ハザードモデルによる末梢神経障害 Grade 3 発現のリスク因子解析

因子	調整ハザード比	95%信頼区間	p 値
クレアチニンクリアランス (mL/min)	0.945	0.904 – 0.988	0.013
喫煙指数 (本/日 × 年)	1.140	1.027 – 1.265	0.014

考 察

本研究では、肺がんに対する Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法における末梢神経障害の発現頻度と発現時期を明らかにした。また、多変量解析の結果より喫煙指数が高いこと、クレアチニンクリアランスが低いことが、末梢神経障害を重篤化させるリスク因子として影響を及ぼすことが示唆された。

Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) のうち、どちらの薬剤が末梢神経障害の発現、重篤化に影響しているかは、各薬剤の末梢神経障害の添付文書による発現頻度を参考にすると、Paclitaxel が 43.8%、Carboplatin が 1～10%未満、Bevacizumab が 12.6%であった。Bevacizumab に関しては、臨床では単独で使用するレジメンが無く、添付文書に記載されているデータは Oxaliplatin との併用療法時のデータであるので発現率が高く記載されていると考えられる。また、Paclitaxel + Carboplatin + Bevacizumab の臨床第 II 相試験の報告によると、Bevacizumab を加えても末梢神経障害の発現頻度や重篤度には変化がないことが記載されている¹⁹⁾。以上より、Paclitaxel の寄与が一番大きいと考えられる。

抗がん剤の末梢神経障害は非血液毒性のひとつであり、まずは末梢神経障害を定量的に評価することが重要であると考えられる。そこで本研究では、CTC-AE ver3.0 の感覚神経障害の評価に基づき、評価者間による評価基準の違いを少なくするために、具体的質問を決め薬剤師が薬剤管理指導時に評価を行った。その結果、Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法 1 コース目における発現時期が明確になり、また 2 コース目以降の末梢神経障害の発現率も明らかとなった。FACS study¹¹⁾などの大規模臨床試験のデータによると、コースごとの Grade 2 以上の末梢神経障害の発現率は記載されているが、1 コース目内での末梢神経障害

の発現時期については示されていない。患者にとっては副作用がいつ起こるかが重要であり、我々のデータを基に、薬剤管理指導業務を行うことは有用だと考えられる。

また、本研究の統計学的解析により喫煙指数、クレアチニンクリアランスが末梢神経障害の重篤化に影響を及ぼす独立した危険因子であることが示された ($p = 0.013$)。調整ハザード比は 0.945 であり、クレアチニンクリアランスが低いほど、末梢神経障害が重篤化しやすいということが本研究で明らかとなった。Paclitaxel は肝臓で代謝される薬物であるが、製造販売元のブリストル・マイヤーズ株式会社が行った使用成績調査における重点調査項目によると、「末梢神経障害」の発現に影響を及ぼす要因を検討した結果、腎機能障害有 (48.4%) で末梢神経障害の発現が高かったことが報告されている。さらに、Paclitaxel の前に Cisplatin を投与した場合、Paclitaxel を先行投与した場合に比べて、Paclitaxel の用量規定因子である好中球減少の発現率が高かったというデータが報告されている²⁰⁾。この原因として Cisplatin を先行投与した場合、Paclitaxel を先行投与した場合に比べて Paclitaxel のクリアランスが 2/3 に減少し、Paclitaxel の血中濃度がするものと考えられている。以上より、Paclitaxel は肝臓で代謝されるが、その体内動態は腎機能にも影響される可能性が高いと考えられる。本研究の結果でも、クレアチニンクリアランスが低いほど末梢神経障害が重篤化しており、これは腎機能が低下している患者では Paclitaxel の代謝・排泄が遅れ、そのため用量規定因子である末梢神経障害が発現しているものと考えられる。

さらに、末梢神経障害の重篤化に影響を及ぼす因子として喫煙指数があげられた ($p = 0.014$)。オッズ比が 1.140 であるので、喫煙指数が高いほど末梢神経障害が重篤化しやすい傾向であることが示唆された。Gauchan らの動物実験の報告

によると⁶⁾、Paclitaxel を投与すると末梢血流量が低下し、強力な血管拡張作用を持つ Limaprost を投与すると末梢血流量が回復することが示されている。長期間に大量の喫煙を行うと、喫煙の影響により末梢血流量が低下し、それが Paclitaxel による末梢神経障害を重篤化させていることが推察される。

Paclitaxel による末梢神経障害に対して、有効性が報告されているビタミン E 製剤や²¹⁾、本邦で適応のあるビタミン B₁₂ 製剤などが臨床現場では使用されているが、効果が不十分であると言わざるを得ない²²⁾⁻²⁴⁾。抗がん剤による末梢神経障害に対して有用な治療薬が存在しない中、末梢神経障害を引き起こしやすい因子を検討することにより、そのような因子が多い症例では、Paclitaxel など末梢神経障害を引き起こしやすい治療薬を回避することができ、それは患者の QOL を保つことにつながると考えられる。進行再発肺がんでは、がん化学療法は根治目的ではなく、延命目的として行われており、患者の QOL を保つことが重要である。本研究の結果は治療選択において、患者 QOL を保つための情報のひとつとなると考えられる。

Paclitaxel 誘発末梢神経障害の先行研究では、末梢神経障害の発現率は、抗がん剤治療コース数の多さと相関すること (OR, 2.379; CI, 1.035-5.466; $p = 0.0412$)²⁵⁾、高齢者の肺がん患者において Grade 2-4 の末梢神経障害の発現率が高いこと ($p = 0.026$) が報告されている²⁶⁾。本研究では、クレアチニンクリアランスの低値と、喫煙指数が高いことがリスク因子としてあげられた。

本研究により、Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法により引き起こされる末梢神経障害の対処法が示されたわけではない。今後は抗がん剤による末梢神経障害に対して有効であると考えられる薬物の prospective clinical trial の実施が望まれる。その際に問題となるのが末梢神経障害の評価であり、コントロー

ル群を正しく評価できることが大切である。本研究で行ったように基準や評価担当者を明確に決め、適切に評価することが必要で、本研究の評価方法が今後の prospective clinical trial に応用できると考えている。

本研究では、肺がんにおける Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法の末梢神経障害重篤化に及ぼす影響因子の検討を行った。抗がん剤の多くの副作用に対して対策が確立されてきているものの、末梢神経障害については有効な薬剤が無く、対策が確立されていないのが現状である。本研究の結果より、クレアチニンクリアランスが低いことが統計学的に末梢神経障害の重篤化の危険因子であることが示され、さらに、喫煙指数が高い場合では、末梢神経障害が重篤化することが示された。進行再発がんでは、患者 QOL を低下させないことが重要であり、末梢神経障害など患者 QOL を低下させるような副作用については、リスクが高い症例では回避することが望まれる。がん化学療法においては個別化医療がキーワードであり、本研究の結果を参考として患者に最適な治療を提供していければと思う。

第2章 Paclitaxelの末梢神経障害作用メカニズムの基礎的研究

緒言

Paclitaxelは、太平洋イチイ科の植物 (*Taxus spp*) の樹皮から抽出された抗悪性腫瘍薬であり、微小管蛋白重合を促進し脱重合を妨げることによって、微小管を安定化させる微小管阻害薬である²⁷⁾。Paclitaxelを投与することによって起こる末梢神経障害は75%以上の患者に発現することが知られている³⁾。げっ歯類にPaclitaxelを投与した場合、機械刺激への異痛に対する痛覚閾値が47~80%低下するとも報告されている²⁸⁾。一方、痛みには急性痛と慢性痛があり、急性痛は組織の損傷が発信源となって生じる生理的な痛みをさし、慢性痛は組織の損傷がないにもかかわらず神経系の歪みによって生じる痛みをさすといわれている。Paclitaxel投与による末梢神経障害では、組織の損傷はみられないにもかかわらずしびれや細かな作業への不自由さなどの症状が生じ、慢性痛に分類される。慢性痛では、痛みを惹起する侵害性刺激に対する閾値の低下が生じるが、非ステロイド性鎮痛薬やモルヒネなどのオピオイドが無効な場合が多く、有効な治療薬の開発は未だ進んでいないため、慢性痛の病態解明や治療法の確立は急務である²⁹⁾。

末梢での痛みの情報は、皮膚内、筋肉内、及び関節内に存在する侵害受容器において活動電位に変換されて、細い無髄線維 (C線維) 又は有髄線維 (A δ 線維) により伝達され、一次知覚ニューロンの細胞体が存在する脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) を経て脊髄後角へ伝達される。その後、神経伝達物質を介したシナプス伝達により二次ニューロンへ伝わり、視床へと伝達されることで痛みとして感じる³⁰⁾。末梢神経からの痛みは、その伝達路であるDRGでいくつか

のナトリウムチャネル、カリウムチャネルや電位依存性カルシウムチャネルが関与し、中枢へと伝達される。

痛みの伝達機構における電位依存性カルシウムチャネルの役割としては、(1) 神経シナプス前部からの神経伝達物質の遊離、(2) 神経シナプス前部と後部における細胞膜の興奮性の増大、(3) 細胞内のカルシウム依存性シグナル伝達機構の活性化が示されているが、Paclitaxel 誘発末梢神経障害と電位依存性カルシウムチャネルがどのような影響を与えるかについては不明な点が多い。

抗がん剤による末梢神経障害の治療薬としては、抗うつ薬の Amitriptyline³¹⁾、抗てんかん薬の Gabapentin³²⁾、漢方薬の牛車腎気丸³³⁾等などの投与が有効であるという報告や、鎮痛薬の Neurotropin が予防効果を示すという報告がある³⁴⁾。しかし、Paclitaxel による末梢神経障害の詳細な発現機序は未だ不明であり、有効な効果を示す治療薬はない。そこで、本研究では Paclitaxel 投与により誘発される末梢神経障害の発現機序について検討を行い、Paclitaxel による末梢神経障害の治療薬開発の一助になればと考える。

本研究では Paclitaxel 投与による機械刺激に対する行動学的検討と、Paclitaxel 投与後の電位依存性カルシウムチャネル $\alpha_2\delta$ -1 リガンドの Gabapentin 投与による機械刺激に及ぼす影響を検討した。また、DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流の電気生理学的検討を行った。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物

動物は Wistar 系雄性ラット（8 週齢、250～350g）を（株）日本医科学動物資材研究所より購入し、使用した。これらの動物は、昭和薬科大学・実験動物施設において、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ に調節され、明暗 12 時間サイクル（7:00～19:00）下で飼育した。また、水及び固形飼料は自由摂取とした。

2. 投与薬の調製方法

1) 投与薬品

Paclitaxel 注射液（タキソール[®]注射液 30 mg、ブリストル・マイヤーズ株式会社）

生理食塩液（大塚製薬）

Polyoxyethylene castor oil（Cremophor[®] ELP、BASF Akiengesellschaft）

Gabapentin（Wako）

2) 投与薬の調製方法

タキソール注射液 30 mg/5 mL を、生理食塩水で 3 倍あるいは 5 倍に希釈した。また、Paclitaxel 投与に対する control として、タキソール[®]注射液の溶媒である Cremophor[®] ELP を用い、生理食塩液で 5 倍に希釈した。

3) 投与方法

Paclitaxel 投与群は、2 mg/kg 投与群と 4 mg/kg 投与群とに分けた。2 mg/kg 投与群にはタキソール[®]注射液を 5 倍希釈したものを、4 mg/kg 投与群には 3 倍希釈したものを、それぞれ day0、day2、day4、day6 に腹腔内に隔日投与し

た。Control 群には、Cremophor® ELP を 5 倍希釈したものを、同様に 0.5 mL/回ずつ 1 日おきに 4 回腹腔内に投与した。

3. Paclitaxel 投与による機械刺激に対する反応への影響

機械刺激に対する行動学的評価は、von Frey hair test にて行った。各ラットを金属メッシュの上に乗せ、透明で中の様子が観察できる容器をかぶせて 10 分以上放置し、馴化させた。その後、金属メッシュの下から後ろ足の裏の中心表面を von Frey フィラメント (2 g; allodynia を惹起する、5g; hyperalgesia を惹起する) にて左右交互に計 5 回刺激した。各刺激は 5 秒間行い、刺激中の逃避行動 (足をあげる、逃げるなど) を起こした回数を観察し、その割合を集計した。実験には control 群では 4 匹、Paclitaxel 投与開始から 7 日後 (day7) の群では 6 匹、14 日後 (day14) の群では 6 匹、21 日後の群 (day21) では 4 匹の動物をそれぞれ用いた。

4. Paclitaxel 投与後の Gabapentin 投与による行動学的評価に及ぼす影響の検討

Gabapentin を精製水にて 100 mg/mL に用時調製し、経口にて 100 mg/kg 投与した。Paclitaxel 投与開始 7 日後 (day7) のラットを用い、Gabapentin 投与 60 分後に行動学的評価を行った。

5. Paclitaxel 投与によるラット DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流への影響

1) 溶液の調製

① Poly-L-lysine の調製

Poly-L-lysine を 1 mg/mL となるように滅菌精製水を用いて希釈した後、0.22 μm フィルター (IWAKI) でろ過滅菌し、さらに 10 $\mu\text{g/mL}$ に希釈して -20°C で保存した。

② HEPES buffer の調製

HEPES 5.36 g を精製水に溶解し 100 mL にしたものと、NaOH 0.9 g を精製水に溶解し 100 mL にしたものを約 2:1 の割合で混合し、pH 7.4 に調整した。

③ F-12 medium isolate 用の調製

F-12 powder 10.6 g、前述した HEPES buffer 100 mL、精製水を total volume 1000 mL となるように加え、混合した後、オートクレーブで滅菌した。その後、penicillin-Streptomycin 混液 10.1 mL を加えて混合し、 4°C で保存した。

④ F-12 medium incubate 用の調製

F-12 solution 500 mL、FCS 55.5 mL、Penicillin-Streptomycin 混液 5.5 mL を加え、混合して 4°C で保存した。

⑤ 記録用細胞外溶液 (External solution) の調製

BaCl 5 mM、TEA 155 mM、MgCl₂ 5 mM、glucose 10 mM、HEPES 10 mM を精製水に溶解し、20% TEA-OH を用いて pH 7.4 に調整した。調製した External solution は 4°C で保存した。

⑥ 記録用パッチ電極内溶液 (Internal solution) の調製

CsCl 120 mM、CaCl₂ 1 mM、MgCl₂ 10 mM、EGTA 10 mM、HEPES 10 mM を精製水に溶解し、Trismabase[®] を用いて pH 7.4 に調整した。調製した Internal solution は 4°C で保存した。

2) ラット DRG 細胞の培養

クリーンベンチで、カバーガラスを 5 mm 四方程度に割り、シャーレに並べ、Poly-L-lysine をガラス片にのせて 90 分程度放置し、コーティングを施した。その後 Poly-L-lysine を吸引し、F-12 medium incubate 用 2 mL で洗浄し、ガラス片をシャーレ上で乾燥させた。

ラットは、Paclitaxel 及び Cremophor[®] ELP の投与開始から 7 日後に DRG を採取し、sample とした。Pentobarbital Na を過量投与し、深麻酔を施した後、背部を切開して椎骨を取り出した。椎骨から DRG を L_{4~6} の部位で採取し、実体顕微鏡下で余分な結合組織を除去した。単離した DRG は F-12 medium isolate 用 1800 μL を含むチューブに入れ、1% collagenase 200 μL を加えた。37°C、shaking 80 rpm、90 分間 incubate 後、1000 rpm、4°C、5 分間遠心分離し、HBSS 2000 μL で洗浄した。さらに同条件で遠心洗浄した後、洗浄した DRG に 1% Trypsin 250 μL、HBSS 1750 μL を加え、37°C、shaking 80 rpm で 10 分間 incubate した。Incubate 終了後、直ちに 0.05% Trypsin inhibitor 100 μL を加え、ピペッティングして反応を停止させた。15000 rpm、4°C、5 分間遠心分離した後、F-12 medium incubate 用 2000 μL で洗浄し、さらに 1000 rpm、4°C、5 分にて同様に遠心洗浄した。その後、F-12 medium incubate 用 70~100 μL を加えてよく混合した後、シャーレ上で乾かしておいたガラス片上に播種し、5%CO₂ 条件下で 37°C、3 時間 incubate した。ガラス片を F-12 medium incubate 用 2000 μL で洗浄し、さらに F-12 medium incubate 用 2000 μL を加え、同条件にて 12 時間 incubate した。

3) 記録用パッチ電極の作製

パッチ電極は、borosilicate 製の芯入りガラス管 (NARISHIGE、GD-1.5)

を使用した。ガラス管はアセトンで 20 分間、続いて 10 分間の超音波洗浄を 2 回繰り返した後、乾燥機にて一昼夜乾燥させたものを使用した。パッチ電極は微小電極作製装置（NARISHIGE、PP-830）を用いて二段引きで作製し、その先端部をマイクロフォージ（NARISHIGE、MF-830）を使い、ヒートポリッシュして滑らかにした。

パッチ電極は、先端部の直径が 1.0~1.5 μm の大きさで、記録用パッチ電極内溶液（Internal solution）を入れて記録用の細胞外溶液に接したときの電気抵抗が、5.0~10.0 $\text{M}\Omega$ となるように作製した。パッチ電極は記録当日に作製し、使用までは密閉容器に保管した。

4) カルシウムチャネル電流の測定

4°Cで保存しておいた External solution をチューブに移し、95% O_2 +5% CO_2 で 10 分程度、十分にバブリングさせ、NaOH で再度 pH を調整した後、シリンジよりポリエチレンチューブを通して測定用チャンバーに供給した。次に DRG 細胞を播種した Poly-L-lysine コートのカバーガラスを External solution で満たしたチャンバーの中に入れた。また、パッチ電極に Internal solution を充填し、電極ホルダーに取り付けた。光学顕微鏡（OLYMPUS）下で測定に用いる細胞を選別した後、パッチ電極を三次元マイクロマニピュレーター（NARISHIGE）で陽圧をかけながら細胞に近づけた。顕微鏡下で細胞にパッチ電極先端が十分近づいたことを目視により確認するとともに、測定用モニターの併用によりさらにパッチ電極を細胞に近づけた。その後、パッチ電極を陽圧から解放し、自動的にギガ・シールが形成されるのを待つか、あるいは電極を徐々に陰圧とすることでギガ・シールを形成させた。しばらく放置してギガ・シールドの安定を確認した後、陰圧をかけて細胞とパッチ電極を

導通させ、whole-cell mode とした。このとき、シール抵抗が 1 G Ω 以上を示していた細胞を実験に用いた。なお、チャンバー内の External solution は 1 時間程度おきに入れ換えを行った。

DRG 細胞のカルシウム電流測定には、測定用アンプに Multi Clamp 700A patch clamp amplifier (Axon Instruments) を用い、測定、記録、解析用ソフトウェアとして pCLAMP8.2 を用いた。

測定では、holding potential を -60 mV とし、-60 mV から +40 mV まで 10 mV ごとステップ状に 20 msec 脱分極させたときに生じる内向きのカルシウムチャンネル電流を測定した。

6. 統計処理

測定結果はそれぞれ平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表現した。有意差検定は、control 群と Paclitaxel 2 mg/kg、4 mg/kg 投与群との間で Dunnett の多重比較検定を実施した。電流-電圧曲線においては、-60 mV から +40 mV において Dunnett の多重比較検定を行った。また、検定は両側で実施し、 $p < 0.05$ と $p < 0.01$ を統計学的に有意であると判断した。

結 果

1. Von Frey hair test を用いた Paclitaxel の機械刺激に対する反応への影響

Paclitaxel を腹腔内に隔日、4 回投与した後の、機械刺激に対する反応への影響を、von Frey hair test を用いて検討した。刺激は 2 g、5 g の von Frey filament で行い、Paclitaxel の投与を開始してから 7 日後、14 日後、21 日後に実施した。

Von Frey hair test の 2 g の刺激に対しては、投与開始 7 日後の Paclitaxel 2 mg/kg 及び 4 mg/kg 投与群の逃避反応率は、それぞれ $33.3 \pm 4.2\%$ 及び $46.7 \pm 8.4\%$ 、14 日後ではそれぞれ $46.7 \pm 4.2\%$ 及び $60.0 \pm 7.3\%$ 、21 日後ではそれぞれ $40.0 \pm 7.3\%$ 及び $66.7 \pm 4.2\%$ であった。これらの値は、いずれも control 群と比較して有意な増加であり、すべての測定時において高用量投与群に強い逃避反応性の増加が認められた (Fig. 7A)。

Von Frey hair test の 5 g の刺激時においても、2 g 刺激時と同様の傾向がみられたが、投与開始 7 日後では、Paclitaxel 投与群の反応増加傾向に統計学的な有意差は認められなかった。しかし、投与開始 14 日後の Paclitaxel 2 mg/kg 投与群 ($53.3 \pm 6.7\%$) 及び 4 mg/kg 投与群 ($80.0 \pm 5.2\%$)、21 日後の Paclitaxel 4 mg/kg 投与群 ($65.0 \pm 9.6\%$) において、control 群と比較して有意な逃避反応の増加がみられた (Fig. 7B)。

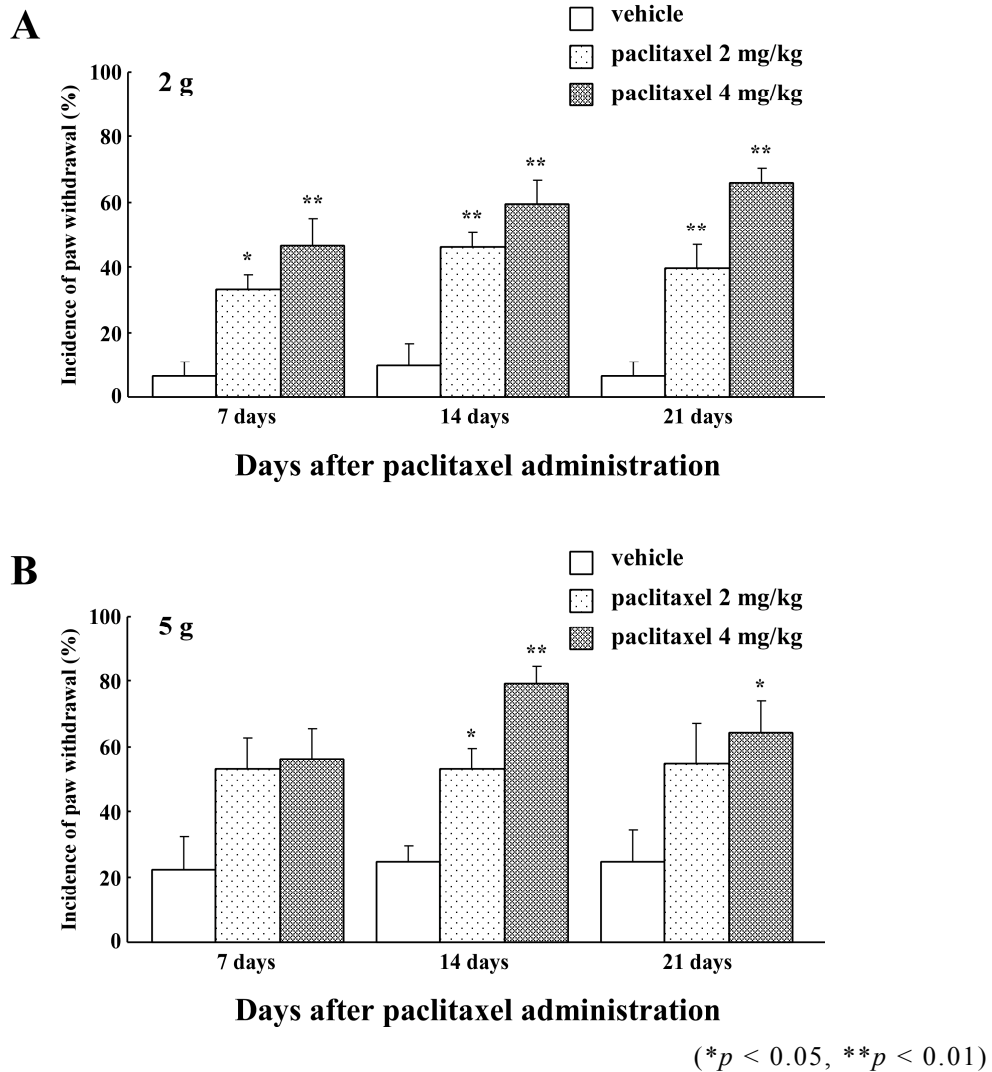


Fig. 7 Paclitaxel 投与による機械刺激に及ぼす影響

2. Paclitaxel 誘発痛覚過敏に対する Gabapentin の影響

カルシウムチャネル $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットの拮抗薬である Gabapentin (100 mg/kg, p.o.) を Paclitaxel 投与ラットに投与して 60 分後、von Frey hair test による機械刺激に対する影響について検討した。

Paclitaxel 4 mg/kg 投与群の投与開始 14 日後における 2 g の機械刺激では、逃避反応率は $52.5 \pm 5.8\%$ であった。Gabapentin の投与により、反応率は $40.0 \pm 12.9\%$ と減少傾向を示したが、統計学的な有意差はみられなかった。一方、5 g の機械

刺激に対しては Gabapentin 非投与群 ($66.0 \pm 5.0\%$) と比較して有意な減少 ($46.0 \pm 7.9\%$, $p < 0.05$) が認められた (Fig. 8)。なお、Gabapentin (100 mg/kg) の単独投与では、逃避反応率に有意な変化はみられなかった。

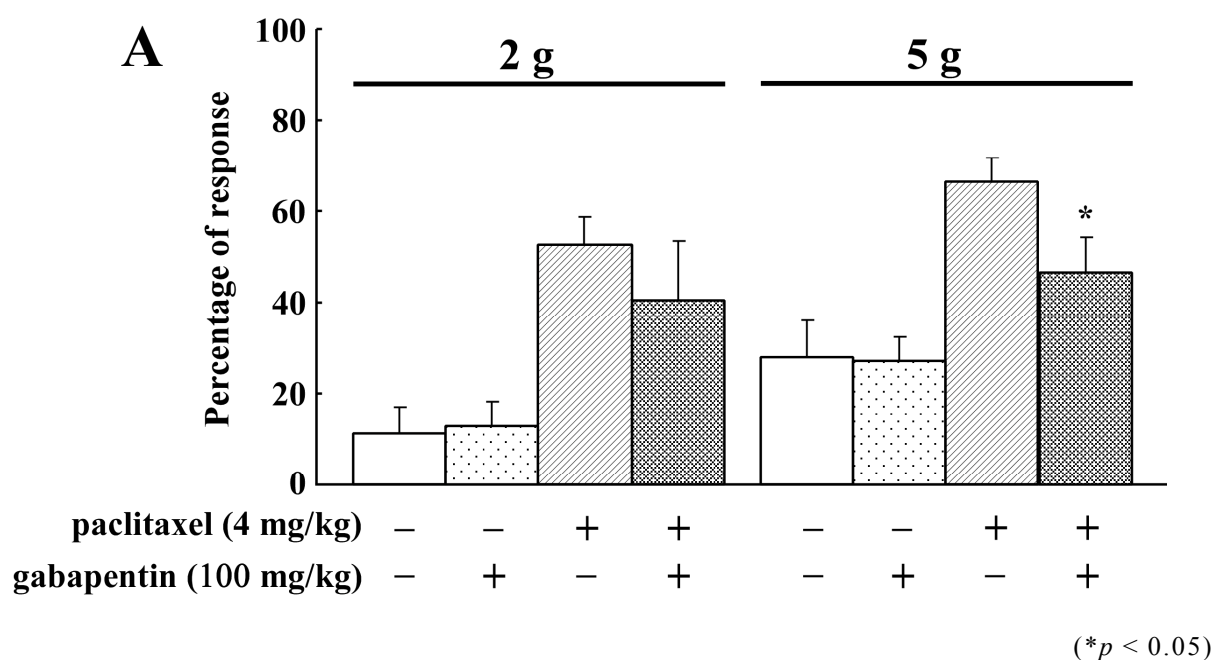


Fig. 8 Paclitaxel 投与による機械刺激に対する Gabapentin の影響

3. Patch clump 法を用いた、Paclitaxel の DRG 小型・中型神経細胞の電位依存性カルシウムチャンネル電流量に対する影響

Paclitaxel の投与開始後 7 日目において、DRG 小型細胞と中型細胞の電位依存性カルシウムチャンネル電流量の変化を、patch clump 法を用いて検討した。

Paclitaxel 2 mg/kg、4 mg/kg 投与群におけるカルシウムチャンネル電流のピーク時の振幅は、control 群と比較して用量依存的に増大した (Fig. 9)。また、ピーク時の電流を細胞の大きさで除した、単位面積あたりの小型・中型神経細胞のカルシウムチャンネル電流量においても、Paclitaxel 2 mg/kg、4 mg/kg 投与群は、control 群と比較して有意な増大を示した (Fig. 10)。

同様に、カルシウムチャネルの電圧－電流曲線についても検討を行った。小型細胞における control 群の電流－電圧曲線のピークは 0 mV 時に -1295.1 ± 389.8 pA であったが、Paclitaxel 2 mg/kg、4 mg/kg 投与群でのピークはそれぞれ -2031.8 ± 396.3 pA、 -3218.5 ± 556.1 pA となり、用量依存的な電流量の増大がみられた (Fig.11)。同様に、中型細胞においても電流－電圧曲線のピークは control 群、Paclitaxel 2 mg/kg、4 mg/kg 投与群でそれぞれ -2143.4 ± 754.4 pA、 -4614.1 ± 1533.4 pA 及び -6549.6 ± 2686.4 pA となった (Fig. 11)。

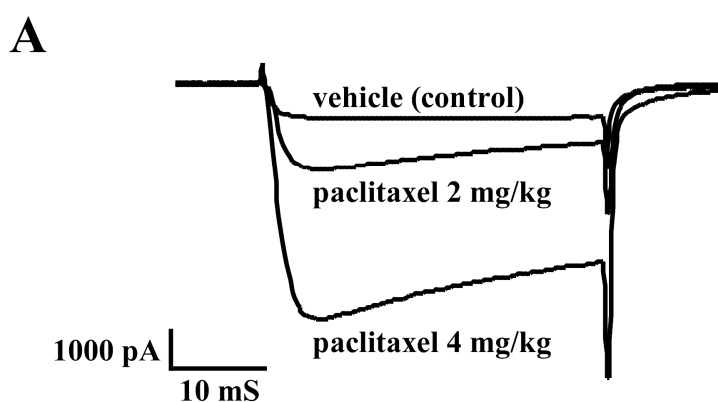


Fig. 9 Paclitaxel 投与による電位依存性カルシウムチャネル電流に及ぼす影響

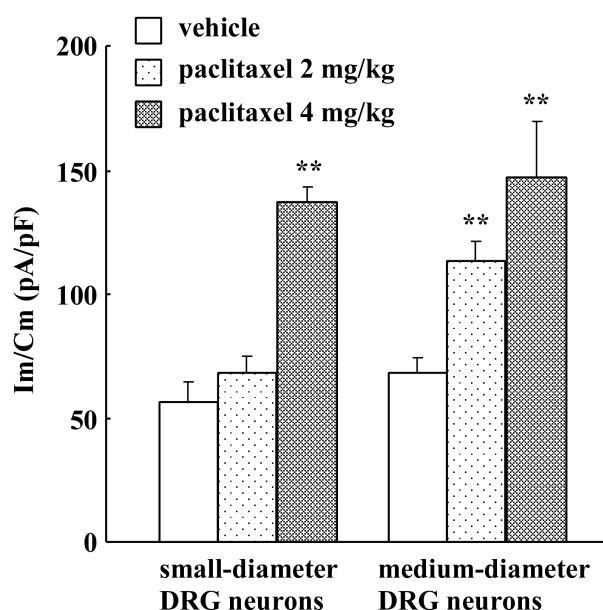


Fig. 10 Paclitaxel 投与による単位面積あたりの電位依存性カルシウムチャネル電流量に及ぼす影響

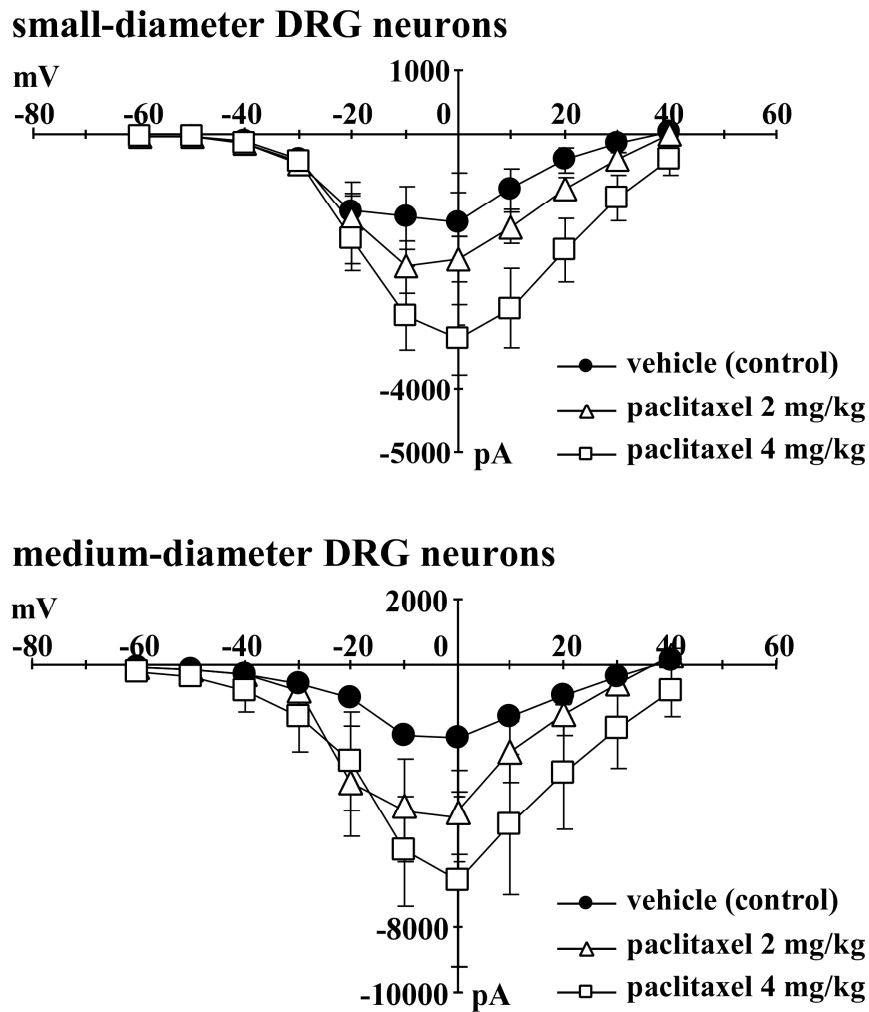


Fig. 11 Paclitaxel 投与による電位依存性カルシウムチャンネル電流の電流-電圧曲線に及ぼす影響

4. Paclitaxel による DRG 小型・中型神経細胞の電位依存性カルシウムチャンネル電流の増加に対する Gabapentin の影響

Paclitaxel 4 mg/kg 投与群の小型・中型 DRG 神経細胞における単位面積あたりのカルシウムチャンネル電流量は、control 群に比較して増大した (Fig. 12)。小型 DRG 神経細胞に対して、Gabapentin をカルシウムチャンネル電流の測定 60 分前に 10 $\mu\text{g/mL}$ あるいは 100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で適用したところ、Paclitaxel による電流の振幅増大作用は、高濃度 (100 $\mu\text{g/mL}$) 処置により有意に抑制された。

なお、Gabapentin の単独適用は、小型 DRG 神経細胞のカルシウムチャンネル電流量に影響を及ぼさなかった (Fig. 12A)。中型 DRG 神経細胞においては、いずれの濃度においても、Gabapentin の適用によりカルシウムチャンネル電流量の濃度依存的かつ有意な抑制が認められた。また、中型 DRG 神経細胞のカルシウムチャンネル電流は、Gabapentin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の単独適用により有意に抑制された (Fig. 12B)。

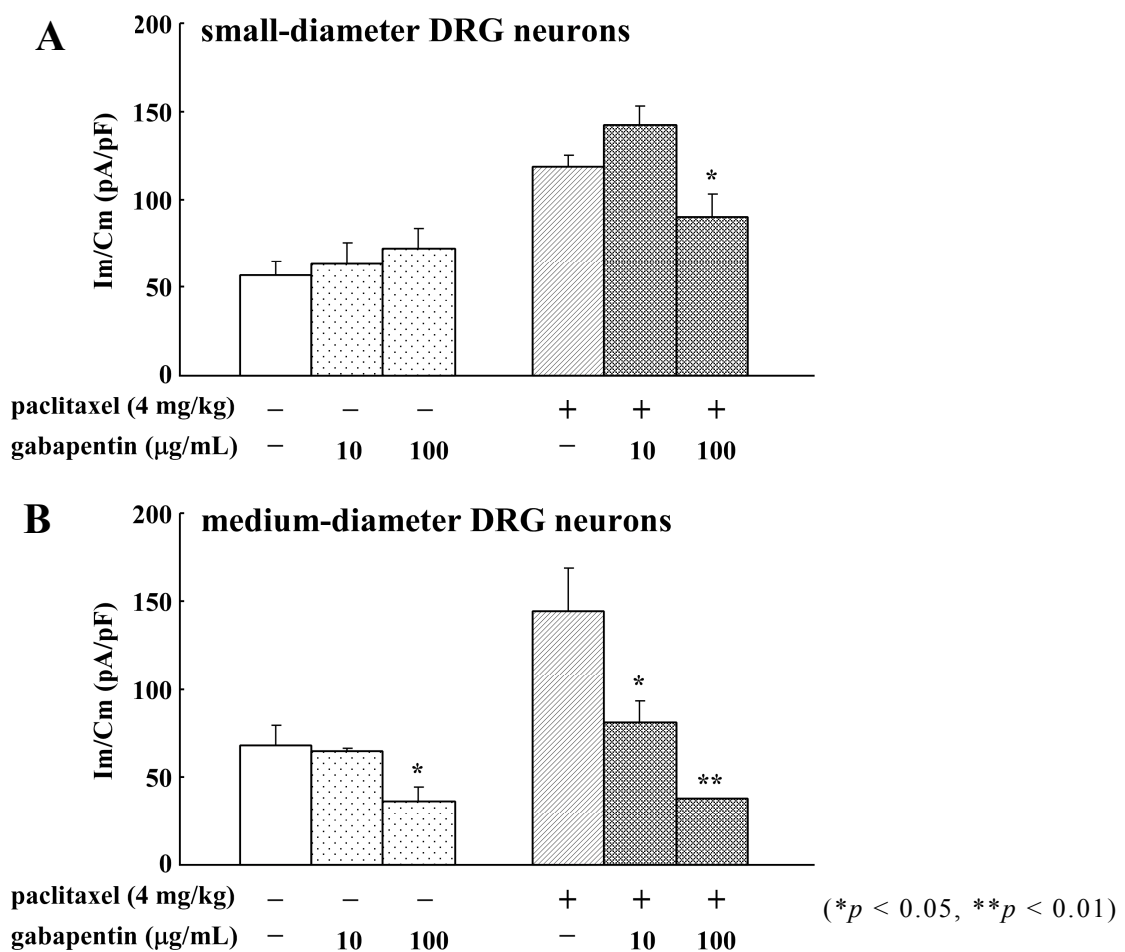


Fig.12 Paclitaxel による単位面積あたりの電位依存性カルシウムチャンネル電流量の増加に対する Gabapentin の影響

考 察

本研究において、ラットに Paclitaxel 2 及び 4 mg/kg を隔日、4 回腹腔内投与することにより、2 g、5 g の機械刺激に対する逃避反応性の増大がみられ、痛覚閾値の低下が確認された。また、反応性の増大は Paclitaxel の用量依存的であった。Von Frey hair test での 2 g の刺激において、control 群ではほとんど逃避反応がみられなかったのに対し、Paclitaxel 投与群では 30～60%の逃避反応がみられた。従って、Paclitaxel の投与により通常では痛みと感じない刺激が痛みとして捉えられる、異痛 (allodynia) が生じたことが示された。これまでに、Paclitaxel の 4 回にわたる腹腔内投与により、allodynia が生じることが報告されており³⁵⁾、今回も同様な結果が得られたと考えられる。また 5 g の刺激に対しては、control 群では 20～30%の回避反応を示したが、Paclitaxel の投与により 50～80%へと増加したことから、通常時には軽度の痛みと感じるような刺激に対して感受性が強くなる、痛覚過敏 (hyperalgesia) が生じたことが示された。Allodynia と同様に、Paclitaxel の投与により hyperalgesia が生じることがも報告されており³⁵⁾、本研究では同様な結果が得られたと考えられる。Rosemary らの報告では、閾値の低下は 28 日間程度持続するとされているが³⁶⁾、本試験条件下では 21 日間の持続的な allodynia 及び hyperalgesia が観察された。さらに、Paclitaxel の投与によって、機械刺激に対する痛覚閾値の低下に加え、熱刺激や冷刺激に対しての閾値の低下も生じることが報告されており³⁶⁾、より詳細な検討が必要である。

電位依存性カルシウムチャンネルは、神経細胞内のカルシウム濃度を調整する重要な機能を有しており、神経障害性疼痛に関与していると報告されている³⁷⁻³⁸⁾。カルシウムチャンネルのうち、神経細胞では N 型の電位依存性カルシウムチャンネルが多く分布していることが知られていることから、本研究で対象としたカルシ

ウムチャンネルは N 型であると考えられる。本研究では、Paclitaxel を反復投与したラットから摘出した小型、中型 DRG 細胞において、電位依存性カルシウムチャンネルの電流量が増大していることを示した。また宮野らは、培養ラット DRG 細胞を用いた検討において、Paclitaxel の処置により細胞内のカルシウム濃度が上昇することを報告している³⁹⁾。これらのことから、Paclitaxel は電位依存性カルシウムチャンネルを賦活化させることが推測される。

一方、C 繊維の軸索を持つ小型 DRG 神経細胞、A δ 繊維の軸索を持つ中型 DRG 神経細胞は、いずれも神経障害性疼痛に関与していることが報告されている^{40, 41)}。本研究では、これらの疼痛に関与する DRG 神経細胞において、Paclitaxel が電位依存性カルシウムチャンネルを活性化させることが明らかとなった。従って、Paclitaxel により誘発される allodynia や hyperalgesia には、小型、中型 DRG 神経細胞における神経伝達機構の過剰な亢進に関与している可能性が示唆された。

Gabapentin は抗てんかん薬であり、特異的に電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットに結合し、神経障害性疼痛を軽減させることが報告されている^{42, 43)}。本研究では、Gabapentin の投与により機械刺激に対する hyperalgesia (von Frey hair test, 5 g) を抑制したが、allodynia (von Frey hair test, 2 g) に対しては影響を及ぼさなかった。また、Gabapentin (100 μ g/mL) の 60 分間処置により、中型 DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャンネルの電流量は有意に減少したが、小型 DRG 神経細胞では顕著な変化はみられなかった。Gabapentin による電位依存性カルシウムチャンネル活性の急性的な減少効果は小さいことが知られており、*in vitro* における検討では、Gabapentin は DRG 神経細胞のカルシウムチャンネル電流やチャンネル発現に急性的な効果はないという報告がある⁴⁴⁻⁴⁸⁾。*In vivo* の実験系では、Gabapentin は短時間では効果は示さないが、慢性的に投与し

た場合ではカルシウムチャネル電流の抑制効果を示し、それは、電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta-1$ サブユニットの細胞膜表面上への発現を抑制することに起因すると報告されている⁴⁷⁾。以上より、細胞の大小などのタイプ、細胞表面での電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta-1$ サブユニットの発現の違いにより、Gabapentin の電位依存性カルシウムチャネルへの影響は異なる。我々の研究結果では、Gabapentin は小型 DRG 神経細胞ではなく、中型 DRG 神経細胞の電位依存性カルシウムチャネルでより効果があることを示している。今後の課題として、Paclitaxel と Gabapentin の電位依存性カルシウムチャネルへの作用機序を明らかにし、感覚神経にどのように関与しているかをさらに検証していくことが必要と考える。

本研究で著者は、Paclitaxel が小型、中型 DRG 神経細胞において電位依存性カルシウムチャネル電流を増加させることを示した。さらに、Gabapentin が Paclitaxel により誘発される hyperalgesia や DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流量の増加を抑制することを示した。

結 論

1. Paclitaxel の末梢神経障害重篤化のリスク因子解析では、肺癌に対する Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法において末梢神経障害を重篤化させる因子として、クレアチニンクリアランス (調整ハザード比 = 0.957; 95% 信頼区間: 0.920–0.996, $p = 0.031$) と喫煙指数 (調整ハザード比 = 1.029; 95% 信頼区間: 1.009–1.050, $p = 0.005$) を示した。このことは肺癌に対する Paclitaxel + Carboplatin (± Bevacizumab) 療法において、クレアチニンクリアランスが低いこと、喫煙指数が高いことが末梢神経障害を重篤化させるリスクが高いことを示している。
2. Paclitaxel による末梢神経障害の発症機序に関する基礎的研究においては、Paclitaxel が機械刺激による allodynia や hyperalgesia を惹起させ、Gabapentin が hyperalgesia を抑制させること、小型、中型 DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流量を増加させることを示した。さらに、Gabapentin の小型、中型 DRG 神経細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流量に対する作用は、特に中型 DRG 神経細胞に対して強い抑制作用がみられることを示した。

Paclitaxel による末梢神経障害は、患者の QOL を低下させる副作用のひとつとして臨床現場では問題となっており、重篤化のリスク因子、末梢神経障害作用機序の解明、治療薬の開発が課題である。本研究では、臨床現場での研究として、末梢神経障害が重篤化するリスク因子の解析、基礎的研究として末梢神経障害の作用機序ならびに治療薬に関する検討を行った。その結果から、基礎的研究で得

られた Gabapentin の効果を、今後は臨床で検証していくことが必要であると考
えられる。また、抗がん剤治療の現場では、末梢神経障害、手足症候群、倦怠感
などの非血液毒性は、患者と医療従事者で評価が異なることが多く、患者は辛い
思いをしているが医療従事者が適切に評価できていない現状があることが報告
されている⁴⁹⁾。今後、末梢神経障害治療薬の効果を検討する際には、今回の臨
床研究で用いた末梢神経障害の評価法が有用であると考えられる。

基礎的研究で小型 DRG 神経細胞と中型 DRG 神経細胞では、Gabapentin の効果
が異なり、A δ 線維を伝達し鋭い痛みを伝える中型 DRG 神経細胞で Gabapentin
の効果がより示された。臨床現場でも Paclitaxel による末梢神経障害に対して、
患者が鋭い痛みを訴えた場合に対する Gabapentin の有効性を検討していくなど、
基礎的研究で得られた情報を臨床現場に応用し、今後さらに臨床研究を進めて行
きたい。

上記の内容は、以下の雑誌に投稿した。

- Kawakami K, Tunoda T, Takiguchi T, Shibata K, Ohtani T, Kizu J, Nishio M, Horai T, Hama T, Taguchi K; Factors exacerbating peripheral neuropathy induced by paclitaxel plus carboplatin in non-small cell lung cancer. *Oncol Res*, **20**, 179-185 (2012).
- Kawakami K, Chiba T, Katagiri N, Saduka M, Abe K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K; Paclitaxel increases high voltage-dependent calcium channel current in dorsal root ganglion neurons of the rat. *J Pharmacol Sci*, **120**, 187-195 (2012).

引用文献

- 1) 国立がん研究センターがん対策情報センター, 人口動態統計によるがん死亡データ (2009).
- 2) 田村和夫. [支持療法の進歩 副作用・合併症対策]末梢神経障害. *Mebio Oncol*, **2**, 51-58 (2005).
- 3) Derry WB, Wilson L, Jordan MA; Low potency of taxol at microtubule minus ends: implications for its antimitotic and therapeutic mechanism. *Cancer Res*, **58**, 1177-1184 (1998).
- 4) Mielke S, Sparreboom A, Steinberg SM, Gelderblom H, Unger C, Behringer D, Mross K; Association of Paclitaxel pharmacokinetics with the development of peripheral neuropathy in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 4843-4850 (2005).
- 5) 河野豊、永田博司; 薬物と神経筋障害 診断と治療の進歩, 薬物による神経障害 末梢神経障害の機序, *日内会誌*, **96**, 1585-1590 (2007).
- 6) Gauchan P, Andoh T, Kato A, Sasaki A, Kuraishi Y; Effects of the prostaglandin E1 analog limaprost on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice. *J Pharmacol Sci*, **109**, 469-472 (2009).
- 7) Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Jonas BM, Sevcik MA, Koewler NJ, Ghilardi JR, Wong GY, Mantyh PW; Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Exp Neurol*, **203**, 42-54 (2007).
- 8) Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group; Chemotherapy in non-small cell

lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials, *BMJ*, **311**, 899-909 (1995).

- 9) Marino P, Pampallona S, Preatoni A, Cantoni A, Invernizzi F; Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer : Chemotherapy vs Supportive Care in Results of a Meta-analysis of the Literature. *Chest*, **106**, 861-865 (1994).
- 10) Grilli R, Oxman AD, Julian JA; Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: How Much Benefit Is Enough? *J Clin Oncol*, **11**, 1866-1872 (1993).
- 11) Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, Tamura T, Nakagawa K, Negoro S, Nishiwaki Y, Saijo N, Ariyoshi Y, Fukuoka M; Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan, *Ann Oncol*, **18**, 317-323 (2007).
- 12) Cella D, Peterman A, Hudgens S, Webster K, Socinski MA; Measuring the side effects of taxane therapy in oncology: the functional assessment of cancer therapy-taxane (FACT-taxane). *Cancer*, **98**, 822-831 (2003).
- 13) du Bois A, Lück HJ, Meier W, Adams HP, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W, Pfisterer J; Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 1320-1329 (2003).
- 14) Rao RD, Michalak JC, Sloan JA, Loprinzi CL, Soori GS, Nikcevich DA, Warner DO, Novotny P, Kutteh LA, Wong GY; North Central Cancer Treatment Group,

Efficacy of gabapentin in the management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A phase 3 randomized, double-blind, placebo- controlled, crossover trial (N00C3). *Cancer*, **110**, 2110-2118 (2007).

- 15) Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Fleishman S, Paskett ED, Ahles T, Bressler LR, Fadul CE, Knox C, Le-Lindqwister N, Gilman PB, Shapiro CL; Alliance for Clinical Trials in Oncology. Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*, **309**, 1359-1367 (2013).
- 16) Kaley T.J, Deangelis LM; Therapy of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Br J Haematol*, **145**, 3-14 (2009).
- 17) Chen YM, Perng RP, Shih JF, Tsai CM, Whang-Peng J; Chemotherapy for non-small cell lung cancer in elderly patients. *Chest*, **128**, 132-139 (2005).
- 18) Lee JJ, Swain SM; Peripheral neuropathy induced by microtubule- stabilizing agents. *J Clin Oncol*, **24**, 1633-1642 (2006).
- 19) Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F; Randomized Phase II Trial Comparing Bevacizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel With Carboplatin and Paclitaxel Alone in Previously Untreated Locally Advanced or Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer, *J Clin Oncol*, **22**, 2184-2191 (2004).
- 20) Rowinsky EK, Gilbert MR, McGuire WP, Noe DA, Grochow LB, Forastiere AA, Ettinger DS, Lubejko BG, Clark B, Sartorius SE; Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J Clin Oncol*, **9**, 1692-1703 (1991).

- 21) Andreas A. Argyriou, Elisabeth Chroni, Angelos Koutras, Gregoris Iconomou, Spiridon Papapetropoulos, Panagiotis Polychronopoulos, and Haralabos P. Kalofonos; Preventing paclitaxel-induced peripheral neuropathy: a phase II trial of vitamin E supplementation. *J Pain Symptom Manage*, **32**, 237-224 (2006).
- 22) Watanabe T, Kaji R, Oka N, Kimura J; Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *J Neurol Sci*, **122**, 140-143 (1994).
- 23) Yamazaki K, Oda K, Endo C, Kikuchi T, Wakabayashi T; Methylcobalamin (methyl-B12) promotes regeneration of motor nerve terminals degenerating in anterior gracile muscle of gracile axonal dystrophy (GAD) mutant mouse. *Neuroscience Letters*, **28**, 195-197 (1994).
- 24) Ahmed A and Kothari MJ; Recovery of neurologic dysfunction with early intervention of vitamin B12. *J Clin Neuromuscul Dis*, **11**, 198-202 (2010).
- 25) Kanbayashi Y, Hosokawa T, Okamoto K, Konishi H, Otsuji E, Yoshikawa T, Takagi T, Taniwaki M; Statistical identification of predictors for peripheral neuropathy associated with administration of bortezomib, taxanes, oxaliplatin or vincristine using ordered logistic regression analysis. *Anticancer Drugs*, **21**, 877-881 (2010).
- 26) Chen YM, Perng RP, Shih JF, Tsai CM, Whang-Peng J; Chemotherapy for non-small cell lung cancer in elderly patients. *Chest*, **128**, 132-139 (2005).
- 27) Schiff PB, Horwitz SB; Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1561-1565 (1980).
- 28) Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ; A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, **94**, 293-304

(2001).

- 29) 砥出 勝雄; 疼痛治療薬の基礎 : 痛みの基礎および新規疼痛ターゲット, *日薬理誌*, **128**, 321-325 (2006).
- 30) Obata K, Noguchi K; Contribution of primary sensory neurons and spinal glial cells to pathomechanisms of neuropathic pain. *BRAIN and NERVE*, **60**, 483-492 (2008).
- 31) Kalso E, Tasmuth T, Neuvonen PJ; Amitriptyline effectively relieves neuropathic pain following treatment of breast cancer. *Pain*, **64**, 293-302 (1996).
- 32) Matsumoto M, Inoue M, Hald A, Xie W, Ueda H; Inhibition of paclitaxel-induced A-fiber hypersensitization by gabapentin. *J Pharmacol Exp Ther*, **318**, 735-740 (2006).
- 33) 下屋浩一郎, 奥野葉子, 国重一郎, 甲村弘子, 有本洋子, 大規芳朗; パクリタキセル投与に伴う末梢神経障害に牛車腎気丸が著効した 1 例. *漢方診療*, **18**, 61 (1999).
- 34) Kawashiri T, Egashira N, Itoh Y, Shimazoe T, Ikegami Y, Yano T, Yoshimura M, Oishi R; Neurotrophin reverses paclitaxel-induced neuropathy without affecting anti-tumour efficacy. *Eur J Cancer*, **45**, 154-163 (2009).
- 35) Flatters SJ, Bennett GJ; Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*, **122**, 245-257 (2006).
- 36) Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ; A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*, **94**, 293-304 (2001).

- 37) Gribkoff VK; The role of voltage-gated calcium channels in pain and nociception. *Semin Cell Dev Biol*, **17**, 555-564 (2006).
- 38) Yaksh TL; Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain. *Pain*, **7**, S13-S30 (2006).
- 39) Miyano K, Tang HB, Nakamura Y, Morioka N, Inoue A, Nakata Y; Paclitaxel and vinorelbine evoked the release of substance P from cultured rat dorsal root ganglion cells through different PKC isoform-sensitive ion channels. *Neuropharmacology*, **57**, 25-32 (2009).
- 40) Gruner W, Silva LR; Omega-conotoxin sensitivity and presynaptic inhibition of glutamatergic sensory neurotransmission in vitro. *J Neurosci*, **4**, 2800-2808 (1994).
- 41) Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K; Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*, **28**, 137-141 (2001).
- 42) Flatters SJ, Bennett GJ; Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*, **109**, 150-161 (2004).
- 43) Field MJ, Cox PJ, Stott E, Melrose H, Offord J, Su TZ, Bramwell S, Corradini L, England S, Winks J, Kinloch RA, Hendrich J, Dolphin AC, Webb T, Williams D; Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **14**, 17537-1742 (2006).
- 44) Martin DJ, McClelland D, Herd MB, Sutton KG, Hall MD, Lee K, Pinnock RD, Scott RH; Gabapentin-mediated inhibition of voltage-activated Ca²⁺ channel currents in cultured sensory neurones is dependent on culture conditions and

- channel subunit expression. *Neuropharmacology*, **42**, 353-366 (2002).
- 45) Vega-Hernández A, Felix R; Down-regulation of N-type voltage-activated Ca²⁺ channels by gabapentin. *Cell Mol Neurobiol*, **22**, 185-190 (2002).
- 46) Kang MG, Felix R, Campbell KP; Long-term regulation of voltage-gated Ca (2+) channels by gabapentin. *FEBS Lett*, **25**, 177-182 (2002).
- 47) Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, Wratten J, Davies A, Dolphin AC; Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **4**, 3628-3633 (2008).
- 48) Heblich F, Tran Van Minh A, Hendrich J, Watschinger K, Dolphin AC; Time course and specificity of the pharmacological disruption of the trafficking of voltage-gated calcium channels by gabapentin. *Channels*, **2**, 4-9 (2008).
- 49) Basch E; The missing voice of patients in drug-safety reporting. *N Engl J Med*, **11**, 865-869 (2010).

謝 辞

本論文の主査を御願ひ致しました薬物治療学研究室・水谷颯洋教授、副査を御願ひ致しました薬剤師実務教育濱本研究室・濱本知之教授、薬品作用学教育堀口研究室・堀口よし江教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、終始丁寧な御指導、ご鞭撻を賜り、本論文の御校閲を賜りました、薬品作用学教育田口研究室・田口恭治教授に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究の実施にあたり、御指導、御教示を賜りましたがん研究会有明病院薬剤部長・濱敏弘博士、副薬剤部長・鈴木賢一先生、慶応義塾大学実務薬学講座・木津純子教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、多大な御協力頂きました奥羽大学薬理学研究室・阿部賢志講師、東京薬科大学機能形態学教室・千葉輝正先生、がん研有明病院薬剤部・角田尚先生、瀧口友美先生、東京労災病院薬剤部・大谷隆之先生ならびにがん研有明病院薬剤部の先生方、薬品作用学教育田口研究室の皆様に深く感謝致します。