

東西医薬融合による癌治療並びに末梢神経障害軽減へのエビデンスの構築

申請代表者	倉石 泰	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	教授
所外共同研究者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学	准教授
所内共同研究者	済木 育夫	病態制御部門病態生化学	教授

【報告セミナー要旨】

癌化学療法は、癌治療の3本柱（手術、放射線治療、癌化学療法）の1つであり、癌細胞が全身に広がった場合は唯一の治療法で、手術による癌摘出前の癌病巣の縮小と術後のフォローでも重要な位置を占める。抗癌薬の多くは、細胞分裂の活発な癌細胞への細胞毒性を薬理作用とするため、細胞分裂の盛んな骨髄の造血細胞、消化管粘膜細胞、毛根細胞などへも影響を及ぼしやすく、骨髄抑制、下痢、嘔吐、脱毛などが副作用として多いが、これらの副作用には対策、予防・治療法が存在する。ところで、パクリタキセルなどの一部の抗癌薬は、副作用として末梢神経障害を引き起こし、その結果、疼痛、痺れ、麻痺等を生じる。末梢神経障害は、患者のQOLの低下に加え、抗癌薬投与の中止の原因ともなる副作用であるが、その治療・治療法は確立されていない。最近、我々は、パクリタキセルを健常マウスに投与して生じる機械的アロディニア（健常では痛みを生じない非侵害性の触刺激で痛みを生じる状態）を、漢方方剤の牛車腎気丸が抑制することを見出した。本研究では、乳癌移植マウスを用いて、パクリタキセルの抗癌作用と副作用としてのアロディニアに及ぼす牛車腎気丸の影響を検討した。実験では、マウスの側腹部乳房近傍の皮下脂肪内に4T1乳癌細胞を移植した。パクリタキセルは、乳癌細胞移植後7日目より隔日に1回、計9回腹腔内注射した。牛車腎気丸（20mg/mouse）は、乳癌細胞移植後2日目から23日目まで毎日1回経口投与した。実験期間（24日間）中、乳癌移植による死亡例はなかったが、パクリタキセル（10, 20mg/kg）投与群で用量に依存して6匹中1, 2匹の死亡が認められた。一方、牛車腎気丸の投与は、パクリタキセルによる死亡例を減少させた。パクリタキセル（10, 20mg/kg）投与が癌の増大を用量依存的に抑制したが、牛車腎気丸はパクリタキセルの抗癌作用に影響しなかった。パクリタキセル投与により後肢足蹠（非担癌部）に持続性の機械的アロディニアが生じたが、牛車腎気丸の予防的投与によりアロディニアの発現が抑制された。なお、担癌部にも癌に起因する機械的アロディニアが生じたが、このアロディニアにはパクリタキセルと牛車腎気丸は影響しなかった。以上の結果から、牛車腎気丸は、乳癌細胞の増殖及びパクリタキセルの抗癌作用に影響することなく、パクリタキセルによるアロディニアを抑制することが明らかとなった。パクリタキセル投与患者に末梢神経障害の結果として生じる疼痛（特に、アロディニア）の予防に牛車腎気丸が有効であることが示唆される。

（連携研究者）早川芳弘 富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

（研究協力者）ムーアクバル バハール

富山大学・大学院医学薬学研究部応用薬理学・大学院修士課程2年

小倉圭介 富山大学・和漢医薬学総合研究所・創薬科学科4年

■背景・目的

現在、癌化学療法は癌治療の中心的な役割を担っており、作用点の異なる多くの抗癌薬が開発されている。抗癌薬の使用目的としては、癌の除去や増殖抑制に加え、手術による癌の摘出前の癌病巣の縮小と術後のフォローと多岐に渡っている。

癌化学療法による抗癌薬の中には癌治療において高い有用性を示すものが多いが、その副作用が問題となっており、主なものが嘔吐と末梢神経障害である。嘔吐は、5-HT₃セロトニン受容体拮抗薬やNK₁タキキニン受容体拮抗薬が制吐薬として開発されたことにより、その対策が可能となった。末梢神経障害は、疼痛やしびれ、感覚および運動の麻痺等を生じる。末梢神経障害に伴う異常感覚は、患者の闘病生活に支障を与えるだけでなく、投薬拒否の原因や投薬中止の指標にもなっている。しかしながら、末梢神経障害に対する治療法は確立されていない。末梢神経障害の治療法の確立には、治療薬のスクリーニングや発生機序の解明に有用な抗癌薬誘発末梢神経障害の動物モデルが必須である。最近、我々は、抗癌薬（パクリタキセル、オキサリプラチン、ビンクリスチン）誘発末梢神経障害性疼痛のマウスモデルを作出し（Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009）、リマプロスト（Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009）やガバペンチン（Gauchan et al., Biol. Pharm. Bull., 2009）の有効性と、漢方方剤の芍薬甘草湯の有効性を明らかにしてきた（Hidaka et al., Eur. J. Pain, 2009）。なお、これらの研究では、癌を移植していない動物（マウス）に抗癌薬を投与した研究であるが、担癌状態では薬物の疼痛軽減効果が異なる可能性もある。

イチイの針葉、小枝などから得られる成分から半合成されたアルカロイドであるパクリタキセルは、乳癌、卵巣癌、子宮体癌などに有効であるが、副作用として末梢神経障害による異常感覚を生じる頻度の高い代表的な抗癌薬でもある。一方、漢方方剤の中には、抗癌作用や転移抑制作用を有するものがあり、前述したように抗癌薬誘発末梢神経障害性疼痛に有効なものがある。本研究では、東西医薬の融合の視点から癌化学療法に有用なエビデンスを構築することを目指し、担癌動物を用いて、西洋薬（パクリタキセル）の抗腫瘍作用と副作用としての末梢神経障害に及ぼす漢方薬の影響を明らかにすることを目的とした。具体には、パクリタキセルが有効である乳癌に着目し、乳癌同所移植マウスモデルを用いて、パクリタキセルと牛車腎気丸を単独投与あるいは併用して、乳癌細胞の増殖と転移、およびパクリタキセルによる末梢神経障害性疼痛に対する効果を検討した。

■結果・考察

<実験方法>

(実験動物)

雌性BALB/c系マウス（実験開始時6週齢）を使用。

(使用薬物)

パクリタキセル（マイライン製薬株式会社、大阪）は、ポリオキシエチレンヒマシ油（cemophor EL®）/エタノール/生理食塩水（1:1:8）混液で1あるいは2 mg/mlの溶液に調製した（マウス体重10 gあたり0.1 ml腹腔内注射：パクリタキセル1あるいは2 mg/kg注射したことになる）。

牛車腎気丸（(株)ツムラ、東京）は、水道水に溶解し、マウス当たり20 mgを200μlの容量で経口投与した。

(乳癌移植マウス)

マウス右下腹部乳房近傍の皮下脂肪組織中にマウス乳癌細胞4T1細胞（5 × 10⁴細胞/20 μl）を移

植した。

(疼痛様行動評価：機械的アロディニア)

疼痛様行動は、細い von Frey フィラメント (0.69 mN 強度) を用いて皮膚に触刺激 (凹み刺激) を加え、刺激に対する反応を下記のようにスコア化した。

① 細胞移植部位での評価 (癌増殖に伴う痛みの評価)

0 (無反応), 1 (後肢の持ち上げ), 2 (後肢の振り, 舐め行動あるいは癌移植部への頭部の振り)

② 癌細胞移植反対側後肢足蹠での評価 (抗癌薬投与による痛みの評価)

0 (無反応), 1 (後肢の持ち上げ), 2 (後肢の振り, 舐め行動)

(癌塊の容積)

癌塊の容積は、長辺 × (短辺)² ÷ 2 で算出した。癌塊容積の評価は、癌塊が確認可能となった日から行った。

(癌塊の重さ)

癌塊の重さは、癌細胞移植後 26 日目に癌塊を摘出して測定した。

(癌転移)

標識した 4T1 細胞移植後の肺への転移を in vivo イメージングで評価した。

(癌細胞移植, パクリタキセル及び牛車腎気丸投与, 疼痛評価スケジュールと投与群)

牛車腎気丸あるいはその溶媒は、癌細胞移植後 2 日目より毎日 1 回投与した。パクリタキセル及びその溶媒は、癌細胞移植後 7 日目より、隔日投与した。疼痛様行動評価は、癌細胞移植前ならびに移植後毎日薬物投与前に行った。薬物の投与及び疼痛様行動評価は、癌細胞移植後それぞれ 23 及び 24 日目まで行った (図 1)。実験群は、表 1 に示す。

表 1. 実験群

群	パクリタキセル あるいは 溶媒	牛車腎気丸 あるいは 溶媒
1	溶媒	溶媒
2	パクリタキセル (10 mg/kg)	溶媒
3	パクリタキセル (20 mg/kg)	溶媒
4	溶媒	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)
5	パクリタキセル (10 mg/kg)	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)
6	パクリタキセル (20 mg/kg)	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)

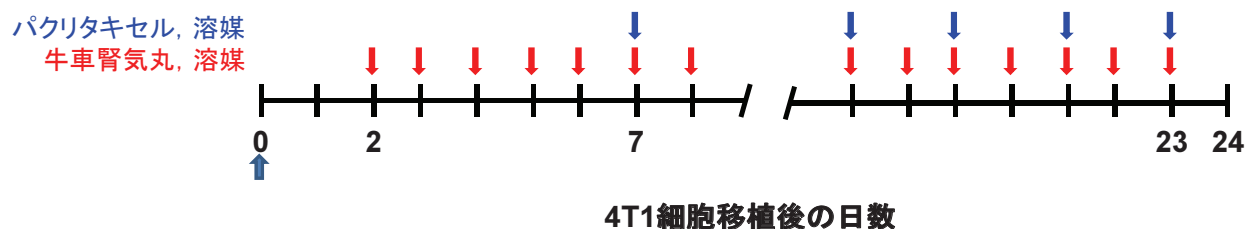


図 1. 投与実験スケジュール

表2. 実験結果のまとめ

群	パクリタキセル あるいは 溶媒	牛車腎気丸 あるいは 溶媒	体重	癌塊体積	癌塊重量	後肢足蹠での 機械的アロディニア	癌移植部での 機械的アロディニア
A	溶媒	溶媒					
B	パクリタキセル (10 mg/kg)	溶媒	A群と同等	A群と比 して減少	A群と比 して減少	A群と比して発生	A群と同等
C	パクリタキセル (20 mg/kg)	溶媒	A群と比し て減少	A群と比 して減少	A群と比 して減少	A群と比して発生	A群と同等
D	溶媒	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)	A群と同等	A群と同 等	A群と同 等	A群と同等	A群と同等
E	パクリタキセル (10 mg/kg)	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)	D群と同等	D群と比 して減少	D群と比 して減少	D群と同等	D群と同等
F	パクリタキセル (20 mg/kg)	牛車腎気丸 (20 mg/マウス)	D群と同等	D群と比 して減少	D群と比 して減少	D群と同等	D群と同等

<実験結果> 【表2】

(生存率)

パクリタキセル及び牛車腎気丸の両溶媒投与並びにパクリタキセルの溶媒及び牛車腎気丸投与癌細胞移植マウスにおいて、移植後24日目までは少なくともすべてのマウスが生存していた。しかしながら、パクリタキセル 10 mg/kg 及び牛車腎気丸の溶媒投与群では癌細胞移植後19日目に1匹、パクリタキセル 20 mg/kg 及び牛車腎気丸の溶媒投与群では移植後18日目並びに24日目にそれぞれ1匹マウスが死亡した。一方、パクリタキセル 10 mg/kg 及び牛車腎気丸投与群では、全てのマウスが24日目まで生存し、パクリタキセル 20 mg/kg 及び牛車腎気丸投与群では癌細胞移植後20日目に1匹マウスが死亡しただけであった。

(体重)

癌細胞移植後24日目で、パクリタキセル 20 mg/kg 及び牛車腎気丸の溶媒投与群は、パクリタキセル及び牛車腎気丸の両溶媒投与群と比べて有意に体重が減少していた。他の群では、体重の減少は認められなかった。

(癌塊の体積)

癌塊の長辺及び短辺の測定により体積を算出した。癌細胞の増殖は、癌細胞移植後8日目より観察された。癌細胞移植後24日目で癌塊の体積を比較すると、パクリタキセルの用量（10及び20 mg/kg）に依存して癌塊の体積の減少が認められた。この減少には、牛車腎気丸による影響は認められなかった。

(癌塊の重量)

癌細胞移植後26日目に癌塊を摘出し重量を測定した。パクリタキセルの用量（10及び20 mg/kg）に依存して癌塊の重量が溶媒コントロール群と比べて有意に減少していた。この減少には、牛車腎気丸による影響は認められなかった。

(癌転移)

in vivo イメージングにより肺への乳癌細胞の転移能への牛車腎気丸の効果を評価したところ、牛車腎気丸単独投与による転移抑制は認められなかった。

(後肢足蹠での機械的アロディニア)

パクリタキセルによる機械的アロディニアの発症を評価するため、癌細胞移植部と反対側の後肢足蹠へ機械刺激を与えたときの後肢の応答を評価した。パクリタキセル（10及び20 mg/kg）投与によ

り、投与後2日目（癌細胞移植9日目）より溶媒投与群と比べて有意に機械的アロディニアが生じた。パクリタキセル投与による機械的アロディニアは、少なくともパクリタキセル投与後17日目（癌細胞移植24日目）まで続いた。牛車腎気丸の併用により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアをパクリタキセルの溶媒投与群と同程度まで抑制した。

（癌細胞移植部での機械的アロディニア）

癌細胞移植部の機械的アロディニアを評価した。癌細胞移植後8日目より機械的アロディニアが生じ、10日目には最大反応を示し、移植後24日目まで続いた。このアロディニアは、パクリタキセルと牛車腎気丸の投与により影響を受けなかった。

<考察>

抗癌薬の副作用の一つである末梢神経障害に対しては治療法が確立しておらず、末梢神経障害による疼痛が患者のQOL低下を招くだけでなく、末梢神経障害の進行に伴い、抗癌薬の投薬中止あるいは薬物の変更など癌化学療法への妨げにもなっている。近年、我々を含め多くの研究グループによって抗癌薬による異常感覚の動物モデルが作出され、異常感覚の評価法が報告されてきた（安東、倉石：ペインクリニック、2010）。また、異常感覚に対する様々な薬物の薬効評価が、これらの動物モデルを用いてなされてきた。これらの動物モデルでは、健常動物へ抗癌薬を投与して末梢神経障害性疼痛を評価しており、末梢神経障害性疼痛の発生機序の解析には有用であるが、臨床の場では、担瘤状態の患者に抗癌薬を投与することも多い。担瘤状態と健常状態では、抗癌薬による末梢神経障害性疼痛に対する治療薬の効果が異なる可能性もある。そこで、本研究では、担瘤マウスへ抗癌薬と漢方方剤を投与して薬理的評価を行った。

乳癌細胞移植により、乳癌細胞の明らかな増殖が認められたが、評価終了の移植後24日目までは少なくともすべてのマウスは生存した。一方、パクリタキセルの連続投与により、乳癌細胞の増殖（癌塊の体積と重量の増加）は抑制されたが、パクリタキセルの毒性のため死亡例も観察された。ところが、牛車腎気丸を併用すると、乳癌細胞の増殖とパクリタキセルの抗癌作用には影響せず、パクリタキセル単独投与群よりも死亡例が減少した。この結果は、パクリタキセルの毒性を牛車腎気丸が軽減させる可能性を示唆する。

次に、担瘤マウスへのパクリタキセル投与による末梢神経障害性異常感覚に対する効果を検討した。本研究では、von Freyフィラメントを用いた機械的アロディニアを評価した。アロディニアは、健常ではほとんど感じられない強さの刺激に対して、過敏になっている感覚異常である。パクリタキセル投与により、機械的アロディニアが生じ、牛車腎気丸はその機械的アロディニアの発生を完全に抑制した。一方、乳癌自体が原因と考えられる担瘤部の疼痛様反応には影響しなかった。我々は、これまでに、健常マウスを用いた実験から、牛車腎気丸の単回および連続投与がパクリタキセル誘発の機械的アロディニアを抑制することを見出しており、本研究と同様の結果を得ている。さらに、オキサリプラチンによる機械的アロディニアの発生を牛車腎気丸が抑制することを見出してきたが、最近、牛車腎気丸が、オキサリプラチンによる結腸癌細胞の増殖抑制に影響せず、オキサリプラチン誘発異常感覚を抑制することが報告された（Ushio et al., Eur J Cancer, 2012）。この知見は、牛車腎気丸が、抗癌薬の効果に影響することなく、抗癌薬による異常感覚の発生を抑制する本研究成果を一致する。しかしながら、抗癌薬による異常感覚に対する牛車腎気丸の抑制作用の機序は、現在のところ不明であり今後の検討課題である。

■結論

牛車腎気丸は、担癌状態でも抗癌薬による異常感覚を抑制し、抗癌薬の主作用（抗癌作用）には影響しなかったことから、担癌患者のパクリタキセルによる末梢神経障害性の軽減に有用な漢方方剤であることが示唆される。