

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08117

研究課題名(和文)ダカルバジンの安全な投与レジメンの開発

研究課題名(英文)Development of methods for reducing venous pain caused by dacarbazine

研究代表者

河野 武幸 (KOHNO, Takeyuki)

摂南大学・薬学部・教授

研究者番号：50178224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダカルバジン(DTIC)は悪性黒色腫や褐色細胞腫の治療薬として広く用いられている抗がん剤である。しかし、光により分単位でDiazo-ICに分解され、血管痛を引き起こすため、血管痛を軽減できるDTICの投与方法の構築には臨床からの強い要請がある。本申請課題では、1) Diazo-ICへの分解を抑制できる調製方法を確立し、2) 動物モデルを用いて疼痛を軽減できる前投薬医薬品を明らかとした。さらに、3) DTICの調製から投与開始までの時間を短縮することで血管痛の発症を抑制できることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Venous pain caused by dacarbazine (DTIC), the anticancer drug, is due to its photodegradation product 5-diazoimidazole-4-carboxamide (Diazo-IC). In this study, we indicated that the methods for reducing degradation of DTIC to Diazo-IC, namely not only shielding against light but also vein F injection decreased the production of Diazo-IC compared with the normal saline and 5% glucose solution and elucidated that premedication drugs such as zaltoprofen and homochlorcyclizine hydrochloride significantly decreased the expression of pain behavior in the DTIC-treated mice. Furthermore, we found that shortening the injection preparation time tended to decrease the local venous pain expression due to DTIC.

研究分野：免疫学, 病態生化学

キーワード：ダカルバジン Diazo-IC 血管痛 ザルトプロフェン

1. 研究開始当初の背景

ダカルバジン (DTIC) はアルキル化剤に分類される抗がん剤であり、悪性黒色腫や褐色細胞腫の治療薬として用いられている。しかし、溶解後の安定性は極めて低く、光によって分解され、分単位で 5-diazoimidazole-4-carboxamide (Diazo-IC) となる (図 1)。これまでに、1) DTIC の静脈内投与が強い血管痛を引き起こすこと、2) その原因物質が Diazo-IC であることがマウスを用いた基礎的研究で報告されている (Kawahara M, et al., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 15-22, 2001)。薬剤によって誘発される血管炎は、2012 年に改定されたチャペルヒルコンセンサス会議分類で「誘因の明らかな続発性血管炎」に分類され、その中でも薬剤性抗好中球細胞質抗体 (ANCA) 関連血管炎が注目されている。この血管炎の原因として、ミノサイクリンやヒドララジンなどの長期投与が挙げられる。しかし、DTIC 投与時に生じる血管痛は、単回投与でも生じることから、ANCA 関連血管炎とは成因が異なる。また、この DTIC による血管痛はジクロフェナクナトリウムでは十分に抑制できないことも報告されている。従って、DTIC による血管痛の要因は、血管傷害時に生じるブラジキニン等の発痛物質の関与が大きいと考えられた。

この血管痛によって、DTIC の投与継続が困難になることも多く、血管痛を軽減できる投与方法の構築には、臨床からの強い要請がある。

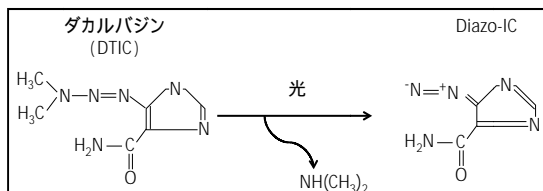


図 1 . DTIC と Diazo-IC

2. 研究の目的

本研究では、DTIC 投与時に生じる血管痛を抑制するための投与レジメンの構築を目的とする。即ち、

- (1) Diazo-IC への分解を抑制できる適切な調製方法を確立する。
- (2) 血管痛を軽減できる前投薬医薬品を動物実験でスクリーニングし、最も血管痛を抑制できる投与レジメンを確立する。
- (3) Diazo-IC の生成を抑制すること (調製後速やかに投与すること) で、血管痛を抑制できることを臨床試験で明らかとする。
- (4) 動物実験で得られた成果を臨床試験で確認する。

なお、(3) 及び (4) の臨床試験は、現在進行中である。

3. 研究の方法

(1) フィルム遮光による Diazo-IC 生成抑制効果

DTIC 及び Diazo-IC と分析条件

DTIC は、ダカルバジン注用 100 (協和発酵キリン (株), 東京) を用いた。また、標準品は、それぞれ、Dacarbazine (東京化成工業 (株), 東京) 及び Diazo-IC (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto) を用いた。DTIC 及び Diazo-IC の測定には、日本分光株式会社製システムステーション (LCSS-905 型)、ポンプ (PU-980)、検出器 (UV-970)、オートサンブラ (AS-950)、カラムオープン (CO-960) から構成される高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた。分析用カラムには、COSMOSIL 5C18-AR- (4.6 i. d. x 250 mm) パックドカラム (ナカライテスク (株), 京都) を用いた。なお、移動相は、10% アセトニトリル/0.5 M 酢酸ナトリウム溶液を用い、1.0 mL/min で送液した。DTIC 及び Diazo-IC は、それぞれ 330 nm 及び 310 nm で検出した。なお、カラム温度は 25℃、試料の注入量は 6 µL とした。

検量線と測定精度

標準 DTIC (1 mg/mL) を大塚生食注 ((株) 大塚製薬工場, 徳島) (生食) を用いて、0, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL となるように調製し、検量線を作成した。同様に、標準 Diazo-IC (1 mg/mL) を 1% クエン酸を含む生理食塩液を用いて、0, 1, 5, 10, 15, 20 µg/mL となるように調製し、検量線を作成した。DTIC 及び Diazo-IC の検量線は、それぞれ、100~500 µg/mL 及び 1~20 µg/mL の濃度範囲で良好な直線性を示した。日内及び日間再現性の検討では、DTIC (200, 300, 400 µg/mL) 及び Diazo-IC (1, 5, 10 µg/mL) の 3 濃度の試料を各 5 回分析した。その結果、日内再現性の DTIC 及び Diazo-IC の変動係数 (CV) は、それぞれ、2.5~2.6% 及び 3.0~8.8% であった。また、日間再現性の DTIC 及び Diazo-IC の CV は、それぞれ、2.0~3.3% 及び 14.2~18.0% であった。

DTIC 溶液の調製と遮光による Diazo-IC の生成抑制効果

ダカルバジン注用 100 を 1 バイアル (100 mg) あたり 10 mL の生食を用いて溶解し、生食を用いて 1 mg/mL となるよう希釈した。DTIC 溶液 (1 mg/mL) を 0.1 mL ずつサンプリングチューブに分注し、遮光なし、アルミホイル遮光、橙色フィルム遮光及び赤色フィルム遮光の 4 条件で、室温 (25℃)、白色蛍光灯下で一定時間保存後、各試料中の DTIC 濃度及び Diazo-IC 濃度を HPLC で測定した (図 2)。



図 2 . それぞれの遮光方法

(2) Diazo-IC の生成を抑制できる輸液の検討

ダカルバジン注用 100 を 1 バイアル (100 mg) あたり 10 mL の生食を用いて溶解した。続いて、生食、大塚糖液 5% ((株)大塚製薬工場, 徳島)(5%Tz), ソリタ-T3 号輸液 (味の素製薬 (株), 東京)(ST3) あるいはヴィーン F 輸液 (興和 (株), 東京)(VF) を用いて 1 mg/mL となるように希釈した。これらの 4 種類の DTIC 溶液 (1 mg/mL) を 0.1 mL ずつ分注し、遮光なし、アルミホイル遮光、橙色フィルム遮光 (遮光度: $59 \pm 0.7\%$) 及び赤色フィルム遮光 (遮光度: $85 \pm 1.0\%$) の 4 条件で、室温 (25 °C)、白色蛍光灯下で一定時間保存した。保存後、各試料中の DTIC 濃度及び Diazo-IC 濃度を HPLC で測定した。なお、各試料の測定は 3~5 回測定し、平均値を算出した。2 種類の遮光フィルムは、それぞれ、テルモ (株) 及び協和発酵キリン (株) 製のものを用いた。

(3) 前投薬医薬品のスクリーニング

ザルトプロフェン、ロキソプロフェンナトリウム、ジクロフェナクナトリウム及びセレコキシブによる血管痛の抑制効果

18 時間絶食した 6 週齢 ddY 系雄性マウスにザルトプロフェン (東京化成工業 (株), 東京)(n=10, 40 mg/kg), ロキソプロフェンナトリウム (和光純薬工業 (株), 大阪)(n=9, 40 mg/kg), ジクロフェナクナトリウム (和光純薬工業 (株), 大阪)(n=10, 30 mg/kg) あるいは、セレコキシブ (和光純薬工業 (株), 大阪)(n=5, 100 mg/kg) を経口投与した。なお、プラセボ群には、注射用水を経口投与した。薬剤投与 30 分後に紫外線 (7 mW/cm²) を 15 分間照射した DTIC 溶液 (10 mg/mL) を腹腔内投与 (0.1 mL/10 g) し、透明なプラスチック製のケージに入れ、疼痛反応を観察した。紫外線の照射時間は、河原ら (Kawahara M, et al., *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 15-22, 2001) の報告で投与された Diazo-IC 溶液 (1 mg/mL) を参考に、最も近い Diazo-IC 濃度となる照射時間である 15 分に設定した。紫外線間照射後の Diazo-IC 濃度は、 0.98 ± 0.04 mg/mL であった (n=5)。疼痛反応は、DTIC 溶液投与から 5 分間隔で 40 分間観察し、マウスの伸展運動及びよじり運動の回数をカウントした。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学会会議: 2006 年 6 月 1 日) 及び摂南大学動物実験に関する規定に従い実施した (承認番号: 13-07-16-04-S-182, 13-10-16-04-S-299, 13-11-16-04-S-340)。

ホモクローシクリジン塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩及びクロルフェニラミンマレイン酸塩による血管痛の抑制効果

18 時間絶食した 6 週齢 ddY 系雄性マウスにホモクローシクリジン塩酸塩 (東京化成工業 (株), 東京)(n=5, 10 mg/kg), ジフェンヒ

ドラミン塩酸塩 (和光純薬工業 (株), 大阪)(n=5, 30 mg/kg), クロルフェニラミンマレイン酸塩 (和光純薬工業 (株), 大阪)(n=5, 4 mg/kg) を経口投与した。なお、プラセボ群には、注射用水を経口投与した。その後、(3) と同様に紫外線を照射した DTIC 溶液を腹腔内投与し、疼痛反応を観察した。

(4) WIN64338 (ブラジキニン B2 受容体拮抗薬) による血管痛の抑制効果

18 時間絶食した 6 週齢 ddY 系雄性マウスに WIN64338 (R&D Systems Inc. MN) を 0.04 mg/kg (n=5), 0.4 mg/kg (n=6) 及び 4 mg/kg (n=5) を経口投与した。なお、プラセボ群には、注射用水を経口投与した。その後、(3) と同様に紫外線を照射した DTIC 溶液を腹腔内投与し、疼痛反応を観察した。

(5) DTIC 投与準備時間と血管痛との関連性

2013 年 4 月 1 日~2014 年 3 月 31 日に京都第二赤十字病院で ABVD 療法を施行した 7 名 (32~84 歳, 中央値: 75 歳, 男/女: 4/3) を対象とし、DTIC 投与準備時間 (DTIC の無菌調製開始から投与開始までに要した時間) と血管痛の発現状況 (血管痛の有無及びその程度 (visual analogue scale (VAS))) を調べた。なお、投与の準備から投与時には、調製前に投与ルートを赤色フィルムで遮光する。続いて、橙色フィルムで遮光したシリンジを用いて DTIC を溶解し、橙色フィルムで遮光した希釈液に混注することとした。本研究は、京都第二赤十字病院に設置された倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号: S24-27)。

4. 研究成果

(1) フィルム遮光による Diazo-IC 生成抑制効果

遮光なし、アルミホイル遮光、橙色フィルム遮光及び赤色フィルム遮光の 4 条件で保存した DTIC 溶液の 330 nm 及び 310 nm の吸光度、即ち、DTIC 及び Diazo-IC 濃度を保存から 0, 30, 60, 120 及び 180 分後に測定した。その結果、DTIC の残存率は、遮光なし、アルミ遮光、橙色フィルム遮光及び赤色フィルム遮光で、94.1, 97.1, 97.8 及び 97.7% であり、顕著な減少は観察されなかった (図 3)。一方、Diazo-IC 濃度は、遮光なしで保存したものでは経時的に増加し、120 分後で最も高く、 6.2 ± 2.6 µg/mL であった。その後、180 分後では、 5.7 ± 0.6 µg/mL と減少傾向を示した。アルミ遮光下の Diazo-IC 濃度は、経時的に若干の増加がみられたものの、180 分後で 1.7 ± 0.2 µg/mL と顕著に Diazo-IC の生成が抑制されていた。同様に、橙色フィルム遮光下及び赤色フィルム遮光下の Diazo-IC 濃度は、180 分後でともに 1.9 ± 0.2 µg/mL でありアルミ遮光と同程度の Diazo-IC 生成抑制効果が示された (図 3)。

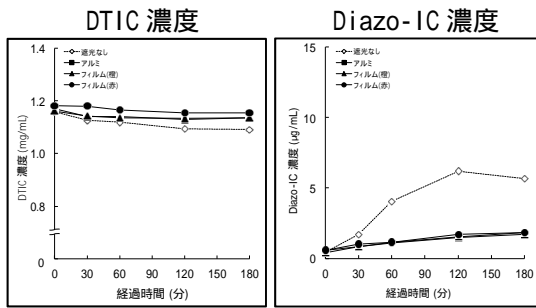


図3 . DTIC 濃度及び Diazo-IC 濃度の経時的推移

(2) Diazo-IC の生成を抑制できる輸液の検討

ダカルバジン注用 100 の添付文書では、溶解後の希釈には、生食あるいは 5%Tz が推奨されている。しかし、この方法を用いても Diazo-IC の生成を防ぐことはできない。そこで本研究では、日常臨床で使用頻度の高い ST3 及び VF を DTIC の希釈に用いた。まず、遮光なし、アルミホイル遮光、オレンジフィルム遮光及び赤色フィルム遮光の 4 条件で保存した DTIC の安定性を調べた。その結果、生食及び 5%Tz での DTIC の残存率は 遮光なし、アルミホイル遮光、オレンジフィルム遮光及び赤色フィルム遮光で、94.1~102% であり、顕著な減少は観察されなかった (図 4)。

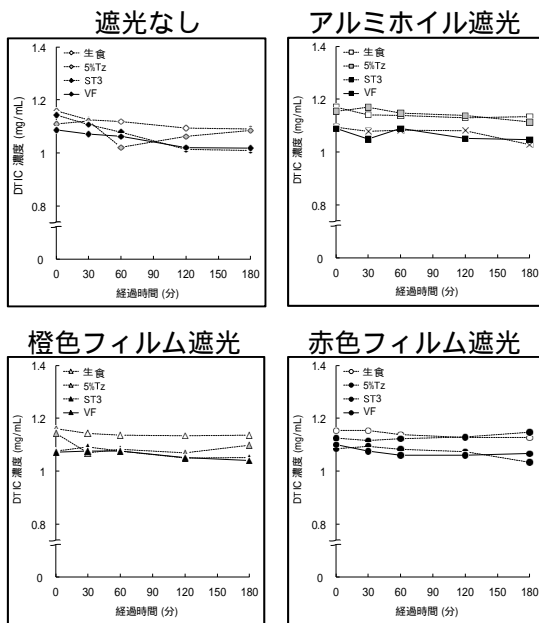


図4 . 各条件における DTIC 残存濃度の推移

遮光なしの 180 分後の Diazo-IC 濃度は、ST3 及び VF でそれぞれ、 15.5 ± 2.3 及び $10.6 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ であり、生食 ($5.7 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$) あるいは 5%Tz ($4.0 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$) と比較して増加した (図 5)。一方、遮光条件下の Diazo-IC 濃度は、ST3 で希釈した場合、すべての遮光条件で、生食あるいは 5%Tz と比較して顕著に増加していた (図 5)。(例えば、アルミホイル遮光、180 分後の ST3 及び生食

の Diazo-IC 濃度は、それぞれ 2.5 ± 0.8 及び $1.7 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$)。それに対して、VF で希釈した場合、すべての遮光条件で、生食と比較して、Diazo-IC の生成が有意 ($P < 0.05$, Student's *t* test) に抑制された (約 20% 抑制) (例えば、アルミホイル遮光、180 分後の VF の Diazo-IC 濃度は、 $1.3 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$)。同様に、5%Tz と比較した場合、有意な差はみられなかったものの、VF による希釈によって Diazo-IC の生成が抑制された (約 10~20%) (図 5)。

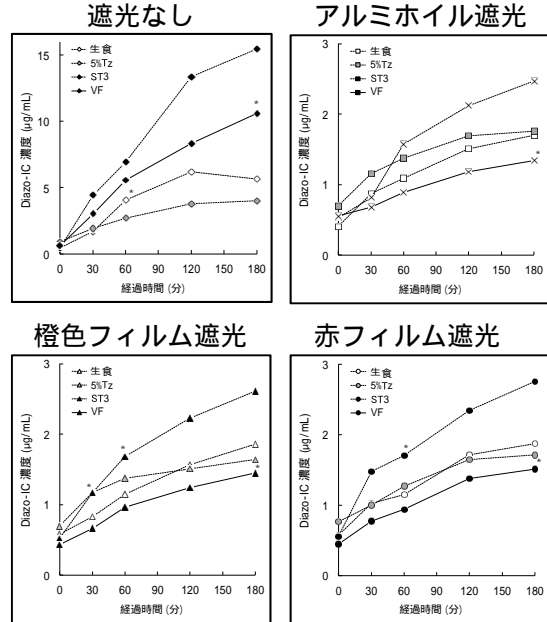


図5 . 各条件における Diazo-IC 濃度の推移

(3) 前投薬医薬品のスクリーニング

本研究の結果から、橙色あるいは赤色フィルムによる遮光が、アルミによる遮光と同等の Diazo-IC の生成抑制効果を有することが示された。また、遮光条件下で VF 輸液を調製に用いることで、生食や 5%Tz を用いた場合と比較して Diazo-IC の生成を抑制できることが示された。しかし、Diazo-IC の生成を完全には抑制できていない。即ち、生成した Diazo-IC によって血管痛が誘発される可能性もある。そこで、血管痛の抑制を目的とした前投薬医薬品 (NSAIDs あるいは抗ヒスタミン薬) の有用性について調べた。

ザルトプロフェン、ロキソプロフェンナトリウム、ジクロフェナクナトリウム及びセレコキシブによる血管痛の抑制効果

ザルトプロフェン、ロキソプロフェンナトリウム、ジクロフェナクナトリウム及びセレコキシブが Diazo-IC による疼痛反応を抑制するか否かをマウスの疼痛反応回数 (伸展運動およびよじり運動の回数) を用いて調べた (図 6)。その結果、プラセボ群では DTIC 溶液投与後、徐々に疼痛反応回数が増加し、35~40 分で最多であった (2.9 ± 0.7 回)。一方、ザルトプロフェン群では、

プラセボ群と比較して 25~30 分でのみ有意な差はみられなかったものの、それ以外の時間帯では全て有意 ($P<0.05$, Mann-Whitney's U test) に疼痛反応が抑制された(図 6)。ロキソプロフェン群及びジクロフェナク群でも一定の疼痛抑制効果はみられたものの、ザルトプロフェン群と比較して弱かった。一方、セレコキシブ群では、有意な疼痛抑制効果はみられなかった。

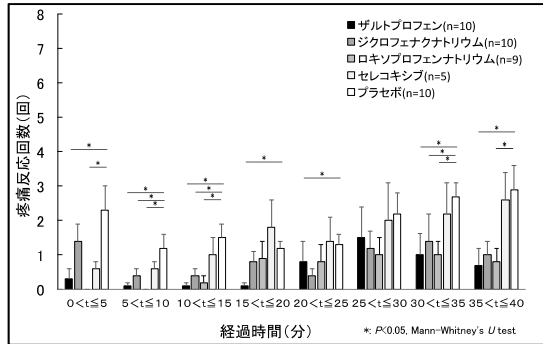


図 6 . NSAIDs による疼痛抑制効果

ホモクローシクリジン塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩及びクロルフェニラミンマレイン酸塩による血管痛の抑制効果

ホモクローシクリジン塩酸塩、ジフェンヒドラミン塩酸塩及びクロルフェニラミンマレイン酸塩が Diazo-IC による疼痛反応を抑制するか否かをマウスの疼痛反応回数(伸展運動およびよじり運動の回数)を用いて調べた(図 7)。その結果、各群間で有意な差はみられなかったものの、ホモクローシクリジン群の 30~35 分及び 35~40 分の疼痛反応回数はそれぞれ、 1.0 ± 0.3 回及び 0.6 ± 0.4 回であり、他の抗ヒスタミン薬と比較して、強い疼痛抑制効果がみられた(図 7)。

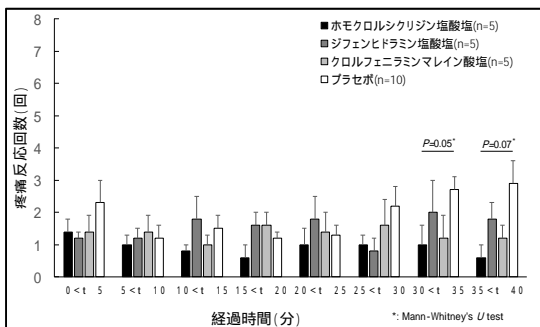


図 7 . 抗ヒスタミン薬による疼痛抑制効果

(4) WIN64338 (ブラジキニン B2 受容体拮抗薬) による血管痛の抑制効果

ザルトプロフェン及びホモクローシクリジンの前投薬によって、他の NSAIDs や抗ヒスタミン薬と比較して、強い疼痛抑制効果が得られた。また、ザルトプロフェン及びホモクローシクリジンは、共通して抗ブラジキニン作用を有することが知られている。そ

こで、ブラジキニン B2 受容体拮抗薬である WIN64338 による疼痛抑制効果を調べた。その結果、WIN64338 の用量依存的に疼痛反応が抑制された(図 8)。これらのことから、Diazo-IC による疼痛の発症にはブラジキニンが強く関与していることが示された。

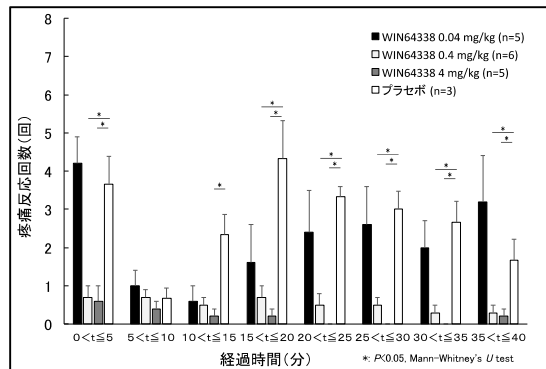


図 8 . WIN64338 による疼痛抑制効果

(5) DTIC 投与準備時間と血管痛との関連性
対象患者 7 名すべての投与回数は延べ 38 回、そのうち血管痛を生じたのは 3 名の患者であり、延べ 9 回であった(表 1)。血管痛が生じた投与時の DTIC の投与準備時間は 42 ± 23 分であり、血管痛が生じなかった投与時の準備時間 (20 ± 8 分)と比較して長時間であった。同様に、血管痛を生じた 3 名の患者の投与準備時間を個別に評価した場合、症例 1: 35 及び 45 分、症例 2: 100 分、症例 3: 33 ± 7 分であり、血管痛を生じなかった場合(症例 1: 18 ± 6 分、症例 2: 18 ± 9 分、症例 3: 17 ± 6 分)と比較して長時間であった(表 1)。発現した血管痛の程度(VAS)は、症例 1: 30 及び 50、症例 2: 30、症例 3: 19 ± 8 であった。また、血管痛発現時の ABVD 療法の投与回数は、症例 1: 3 及び 9 回目、症例 2: 4 回目、症例 3: 1~3 及び 7~9 回目であった。

表 1 .DTIC の投与準備時間と血管痛発現状況

| 血管痛の有無 | 患者数 | 投与回数 | 投与準備時間(分) |
|--------|-----|------|-------------|
| あり | 3 | 9 | 42 ± 23 |
| なし | 4 | 29 | 20 ± 8 |
| 計 | 7 | 38 | |

| | 総投与回数 | 血管痛あり | | 血管痛なし | |
|------|-------|-------|------------|-------|------------|
| | | 投与回数 | 投与準備時間(分) | 投与回数 | 投与準備時間(分) |
| 症例 1 | 9 | 2 | 40 ± 7 | 7 | 18 ± 6 |
| 症例 2 | 8 | 1 | 100 | 7 | 18 ± 9 |
| 症例 3 | 12 | 6 | 33 ± 7 | 6 | 17 ± 6 |

(5) 今後の展望

本研究で最も強い疼痛抑制効果が得られたザルトプロフェン及びホモクローシクリジンは、既に臨床で用いられている医薬品である。また、本研究課題は、臨床からの強い要請に基づいて起案したものである。従って、

本研究成果は直ちに実地臨床への還元が可能であり、患者負担を軽減できる投与レジメンの構築が可能と考えられる。

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2件)

辻 琢己, 大坪達弥, 河野武幸: ダカルバジンによる血管痛を抑制できる前頭葉医薬品, *BIO Clinica*, 査読有, **32**, 62-64 (2017).
大坪達弥, 辻 琢己, 梅山貴生, 首藤みほ, 米須香那, 松本美菜子, 吉田侑矢, 坂野理絵, 友金幹視, 藤田敦夫, 河野武幸, 三上正: ダカルバジン投与における血管痛対策の検討, *YAKUGAKU ZASSHI*, 査読有, **137**, 363-369 (2017).

[学会発表](計2件)

松井久明, 菊田真穂, 大坪達弥, 友金幹視, 辻 琢己, 河野武幸: ダカルバジンによる血管痛は抗ブラジキニン作用で抑制される-ddY マウスを用いた検討-, 日本薬学会第138年会 (2017).
大坪達弥, 辻 琢己, 友金幹視, 藤田敦夫, 魚嶋伸彦, 小林裕, 河野武幸, 三上正: ダカルバジン投与時に生じる血管痛の抑制, 第13回日本臨床腫瘍学会 (2015).

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-rinsho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 武幸 (KOHNO, Takeyuki)
摂南大学・薬学部・教授
研究者番号: 5 0 1 7 8 2 2 4

(2) 連携研究者

辻 琢己 (TSUJI, Takumi)
摂南大学・薬学部・准教授
研究者番号: 9 0 4 5 4 6 5 2

吉田 侑矢 (YOSHIDA, Yuya)
摂南大学・薬学部・講師
研究者番号: 5 0 5 8 1 4 3 5

坂野 理絵 (BANNO, Rie)
摂南大学・薬学部・助教
研究者番号: 9 0 7 3 6 8 4 4

(3) 研究協力者

三上 正 (MIKAMI, Tadashi)
大坪 達弥 (OHTSUBO, Tatsuya)