

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590138

研究課題名（和文） 外来がん化学療法で利用可能なパクリタキセルの有害事象予測因子の探索

研究課題名（英文） Study on predictive factors for chemotherapy-associated neutropenia in outpatients treated with paclitaxel

研究代表者

賀川 義之（KAGAWA YOSHIYUKI）

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：90397505

研究成果の概要（和文）：

タキサン系抗がん剤のパクリタキセルが好中球減少症などの有害事象を引き起こす因子を、外来がん化学療法の普及を考慮した上で明らかにすることを目的とした。血液中パクリタキセル濃度を広範囲に精度よく定量する LC-MS/MS 法を開発した。患者の血漿中 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel/パクリタキセルモル濃度比は、同じ投与レジメンであっても個体間変動が大きく、有害事象との関係が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to identify predictive risk factors for developing neutropenia after chemotherapy with paclitaxel. We successfully developed a new quantitative method for determination of blood paclitaxel concentration using LC-MS/MS. In clinical study, the wide interindividual variation in molar ratios of plasma 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel/ paclitaxel concentration was seen. More patients are, however, needed to identify predictive risk factors with paclitaxel-based chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：がん化学療法、パクリタキセル、好中球減少症

## 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法においては、抗がん剤投与に伴う有害事象が用量規制因子であり、腫瘍組織摘出術後の免疫能低下などとも関連し、がんの進展ではなく、抗がん剤投与による汎血球減少などの有害事象によって患者の生命

が脅かされる場合もある。抗がん剤の血中濃度や術後の免疫能の低下が、その後起きる有害事象と関連することは、これまで多くの抗がん剤およびがん腫で明らかにされてきた。

タキサン系抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) は、非小細胞肺癌、卵巣癌、胃癌、子宮体癌、乳癌などの標準治療法に組み込まれており、カルボプラチン (CBDCA) などの白金系抗がん剤との併用頻度が高い。PTX などの抗がん剤による好中球減少は、重篤な感染症の引き金となる。PTX の投与に伴う有害事象として、好中球減少症のほかに末梢神経障害、嘔気・嘔吐などの頻度が高い。PTX による好中球減少症は、一定の PTX 血漿中濃度 ( $0.05 \mu\text{M}$  以上) が持続する時間と相関することが報告されているが、血漿中濃度測定には投与 24 時間以降の数回の採血時点が必要であり、その予測精度も実用可能領域に達していない。近年、外来がん化学療法が普及しており、血中濃度測定のために採血可能であるのは、患者が治療を終えて帰宅するまでの抗がん剤投与後数時間だけである。また、外来治療では、好中球数が減少する時期を患者が自宅で過ごすことになるため、好中球減少症の予測は、重篤な感染症を防ぐ上で極めて重要である。そこで、外来がん化学療法に対応して、外来診療で抗がん剤を投与される患者に対して利用可能な有害事象の予測因子の同定が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、PTX が好中球減少症などの有害事象を引き起こす因子を、外来がん化学療法の普及を考慮した上で明らかにする。すなわち、有害事象の発現に関与する因子を探索して、好中球減少症などに起因する敗血症などの有害事象の発現防止に応用することを目的とする。探索する因子のうち、薬物動態パラメータは外来治療で入手可能なものを優先して用いる。したがって、本研究では PTX 投与終了 2 時間後までの PTX および代謝物の血中濃度、それらの薬物血中濃度-曲線下面積 (AUC)、PTX の薬物代謝に関与する CYP2C8 など酵素の分子種および排泄に関与する P 糖タンパク質の遺伝子多型を単独あるいは組み合わせて統計学的手法を用いて評価し、好中球減少症などの PTX による有害事象を引き起こす因子を多面的に解析し明らかにする。

また、血液中 PTX 濃度の測定には、高速液体クロマトグラフィーやタンデム型高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) が用いられてきたが、臨床での極低濃度の測定に対応できる測定法は確立されていない。そこで、LC-MS/MS と市販の固相抽出カラムを組み合わせて、臨床現場での使用を可能とする PTX 血中濃度の微量測定法の開発に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

本研究では静岡県立総合病院でがん治療を受けている患者の中で、PTX  $200 \text{ mg/m}^2$  と CBDCA を 3 週間間隔で併用投与されている (tri-weekly regimen) 非小細胞肺癌患者を対象とする。PTX を含むがん化学療法を受けている外来および入院患者から経時的に血液を採取し、PTX および代謝物の血中濃度 (Total 濃度および蛋白遊離形濃度) を LC-MS/MS を用いて測定する。患者の血液検体から DNA を抽出して、P 糖タンパク質をコードする ABCB1 遺伝子および PTX の代謝酵素をコードする CYP2C8 などの遺伝子の多型を検出する。がん化学療法施行前後の白血球数、好中球数、血小板数、肝機能、腎機能など臨床検査値を経時的に測定し、薬物動態との関連を調査する。がん化学療法施行後の有害事象について、NCI-CTC (National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria) に基づいて重篤度を定期的に観察する。本研究は静岡県立総合病院の臨床研究倫理委員会の承認を得たのちに開始する。被験患者には文書を用いて研究の内容を説明し、インフォームドコンセントを実施し文書で同意を得る。

## 4. 研究成果

血液中の PTX 濃度を測定する手段として、逆相系カラムに接続したセミマイクロ高速液体クロマトグラフィーを用いる定量方法を以前に開発している。さらにより低濃度の血中濃度測定に対応するため、LC-MS/MS (API 3200 Qtrap, ABSCIEX) を用いた測定系を新たに構築することを試みた。すなわち、C18 逆相系カラム (Mightysil RP-18MS 150-2.0,  $5 \mu\text{m}$ , 関東化学)、内部標準物質にドセタキセル (DCX)、溶離液に  $2 \text{ mM}$  酢酸アンモニウム ( $\text{pH } 6.8$ ) 水溶液: アセトニトリル =  $35 : 65$  (v/v) を用い、エレクトロスプレーイオン化法により PTX の質量電荷比 (m/z)  $854 \rightarrow 509$ 、PTX の不活性代謝物  $6 \alpha$ -hydroxypaclitaxel ( $6 \alpha \text{ OH-PTX}$ ) m/z  $871 \rightarrow 525$ 、内部標準物質 DCX m/z  $808 \rightarrow 528$  を検出した。この条件で PTX、 $6 \alpha \text{ OH-PTX}$  および DCX の保持時間は、それぞれ 3.2 分、2.7 分および 3.1 分であり、5 分以内に全成分の溶離が終了した。血液検体での検出感度は、PTX および  $6 \alpha \text{ OH-PTX}$  の両方で  $1 \text{ ng/mL}$  以下を達成した。さらに、血液中の PTX の効果的な抽出法を開発するため、液-液抽出法と固相抽出法を比較検討した。アセトニトリルを用いた液-液抽出法に比べ、固相抽出法ではより良好な検出感度が得られた。固相抽出法の中で、Oasis HLB (30mg, 1cc, Waters)、Oasis MCX (30mg, 1cc)、Oasis WAX (30mg, 1cc) および Oasis WCX (30mg, 1cc) を用

いて、薬物を含まない血漿に添加した PTX の回収率を比較した。血液サンプルにおいて、Oasis HLB、Oasis MCX、Oasis WAX および Oasis WCX を使用した場合の PTX の回収率は、それぞれ 95% 以上、30% 以上、90% 以上および 50% 以上であった。Oasis HLB が他の固相カラムに比べ、血液サンプルからの PTX の抽出工程でより良好な回収率を示したことから、臨床検体の処理に Oasis HLB を採用することとした。血液サンプルの固相抽出は、患者血液を 2% リン酸水溶液で 5 倍に希釈したのち、固相抽出カラムにローディングし、2% 蟻酸水溶液でカラムを洗浄後、100% メタノールで目的とする化合物を溶出させた。メタノール溶出液を遠心エバポレータに移し 45°C で 3 時間かけて蒸発乾固させた。蒸発乾固させたサンプルに LC-MS/MS 用の溶離液を加えて再溶解させ、その 10  $\mu$ L を LC-MS/MS に注入した。薬物を含まない血漿に PTX、6 $\alpha$  OH-PTX および DCX を添加した試料を用いて検量線を作成したところ、図 1 および図 2 に示したように、1 ng/mL から 1000 ng/mL の範囲内で重相関係数  $R^2 = 0.9999$  以上の極めて良好な相関が得られた。

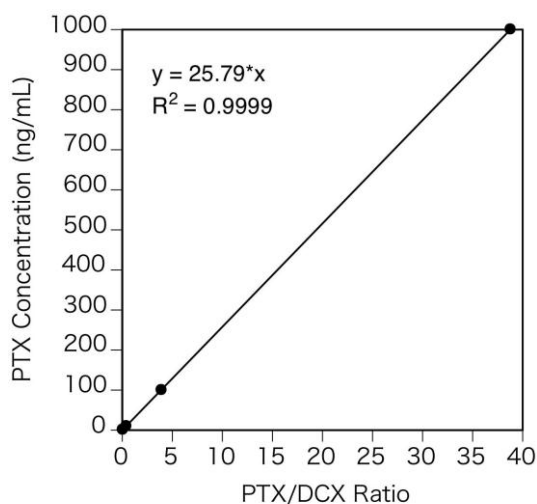


図1 パクリタキセルの検量線

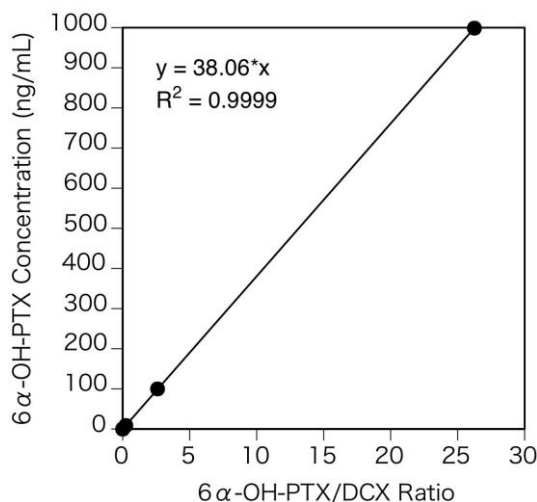


図2 6 $\alpha$ -hydroxypaclitaxel の検量線

今回開発した LC-MS/MS による PTX および 6 $\alpha$  OH-PTX の血漿中濃度測定法は、血液検体の採取から血中濃度の測定結果を得るまで、作業に要する時間は 4 時間以内であり、臨床現場での利用に十分に耐えうると考えられた。

薬物代謝に関わる遺伝子多型の検出方法を検討する中で、1 塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) の迅速検出法の開発に取り組み、キャピラリー内で短時間に標的遺伝子を増幅し検出するリアルタイム PCR 法を応用した LightCycler<sup>®</sup> を用いて、CYP2C9 および CYP2C19 を迅速に検出する方法を確立した。この LightCycler<sup>®</sup> 法を用いて、てんかん患者の臨床検体で CYP2C9 および CYP2C19 の SNP 検出に成功している。さらに LightCycler<sup>®</sup> を用いる CYP2C8 や CYP3A4 など PTX の代謝に関与する代謝酵素への応用が期待される。

今回の報告時点では臨床研究の最終的な解析に必要な目標症例数に達していないが、これまでに得られた結果を報告する。PTX 点滴投与終了後 1 時間における患者血漿中 Total 濃度は 1000~4000 ng/mL を示し、また、6 $\alpha$  OH-PTX の血漿中 Total 濃度は 400~2500 ng/mL を示した。PTX 点滴投与終了後 1 時間の PTX の血漿中濃度は、同じ投与レジメンにもかかわらず患者間で最大約 3 倍の差がみられた。一方、PTX 点滴投与終了後 1 時間における 6 $\alpha$  OH-PTX の血漿中濃度は、患者間で最大約 6 倍の差がみられた。各血漿中濃度測定時点における患者毎の 6 $\alpha$  OH-PTX/PTX モル濃度比は大きく異なり、顕著な個体間変動が認められた。PTX 点滴投与終了後 1 時間の血漿中濃度における 6 $\alpha$  OH-PTX/PTX モル濃度比は患者間で最大約 4 倍の差がみられた。

PTX 投与の 10 日から 14 日で投与患者の白血球数や好中球数は nadir に達した。その後徐々に回復し、投与 3 週間後の次回抗がん剤投与時には投与前のレベルまで回復していた。

以上のことから、我々は PTX および 6 $\alpha$  OH-PTX の高精度かつ臨床適用可能な血中濃度測定法の開発に成功した。6 $\alpha$  OH-PTX/PTX モル濃度比に大きな個体間変動がみられることは、その変動が PTX の消失過程と密接に関係すると考えられることから、P 糖蛋白などの遺伝子多型と組み合わせることで、PTX による好中球減少症などの有害事象の予測に利用可能となると期待される。PTX の薬物動態と有害事象との関係をより精度を高めて解析するため、さらに多くの臨床検体を収集して検討しつつある。

## 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)

- ① Yoshiyuki Kagawa, Toshio Maeda, Yasuhiro Kato, Iori Ueda, Tomoko Kudo, Naoe Watanabe, Midori Kimura, Sato Minami, Tatsuichiro Sakamoto, Hiroshi Yamada, Masakazu Takagi. Influence of the Slow Infusion of a Soybean Oil Emulsion on Plasma Cytokines and Ex Vivo T Cell Proliferation After an Esophagectomy. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 査読有, 2013, 37(1):123-8. DOI: 10.1177/0148607112442216
- ② 山本吉章, 高橋幸利, 西村成子, 幾見泰洋, 三島信行, 賀川義之, Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) 及び Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) の Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 迅速測定法の開発と小児てんかん患者への臨床応用, 薬学雑誌 (YAKUGAKU ZASSHI), 査読有, 131(5), 809-815 (2011)  
<http://dx.doi.org/10.1248/yakushi.131.809>

[学会発表] (計2件)

- ① 山本吉章, 松田一己, 高橋幸利, 井上有史, 賀川義之: ラモトリギンの血中濃度に影響を及ぼす抗てんかん薬の検討, 第21回日本医療薬学会年会(神戸)、要旨集、p329、2011年10月1日
- ② 山本吉章, 宮川紘, 高橋幸利, 今井克美, 松田和己, 井上有史, 賀川義之: クロバザムおよびN-デスマチルクロバザムの薬物動態に影響を与える因子の検討, 第22回日本医療薬学会年会(新潟)、要旨集、p443、2012年10月28日

[図書] (計2件)

- ① 賀川義之他編(分担執筆), 南山堂, Visual Core Pharma 薬物治療学 改訂2版、2013、pp 130-155.
- ② 賀川義之他著(分担執筆)、南山堂、病気と薬パーフェクトブック 2012、2012、pp 681-682.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

賀川 義之 (KAGAWA YOSHIYUKI)

研究者番号: 90397505