

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790511

研究課題名（和文） がん化学療法における併用薬の使用実態調査と相互作用の予測に基づく安全性の確立

研究課題名（英文） Drug utilization study and safety evaluation based on prediction approach for drug interactions in chemotherapy

研究代表者

吉田 直子（YOSHIDA NAOKO）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：20565428

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん化学療法における医薬品使用の安全性を確立することを目的として、抗がん薬と漢方薬を含む併用薬の使用実態を調査し、併用される漢方薬が抗がん薬の安全性に及ぼす影響を評価した。その結果、paclitaxel または irinotecan を使用した患者において Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 の grade 3 以上の血小板減少の発現と大建中湯または半夏瀉心湯の併用にそれぞれ有意な関連性が認められた他、一部の漢方薬の併用が骨髄抑制、電解質異常、肝機能検査値異常等の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to describe utilization of anticancer drugs and concomitant medicines including Kanpo medicines, and evaluate safety of concomitant Kanpo medicines in chemotherapy. As a result, Co-administration of Daikenchuto or Hangeshashinto, in patients treated with paclitaxel or irinotecan, respectively, showed significant association with decrease of platelet count over grade 3 based on Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 criteria. In addition, some of co-administrated Kanpo medicines could affect occurrence of adverse effects, such as myelosuppression, electrolyte abnormality, or hepatic dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬剤疫学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・相互作用、がん化学療法、漢方薬

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法において、抗がん薬による副作用は必発であり、その対策は、アドヒアランスの向上と有効な治療を中断させないた

めに非常に重要である。抗がん薬により生じる悪心・嘔吐に関しては、American Society of Clinical Oncology や National Comprehensive Cancer Network よりガイドラインが明確に示され、ステロイド薬、5-HT₃ 受容体拮抗薬、

D₂ 受容体拮抗薬などを用いた積極的な制吐療法が推奨されている。下痢に関するガイドラインや好中球減少症に対する G-CSF 製剤使用のガイドラインなど、最新のエビデンスに基づいたガイドラインが発表され、医薬品の適正使用が図られている。一方、日本においては、抗がん薬による末梢神経症状や下痢などの副作用を軽減することを目的に、漢方薬がその対症療法にしばしば使用される。近年、半夏瀉心湯、大建中湯、牛車腎気丸などの漢方薬について、抗がん薬による下痢、末梢神経障害などの副作用に対する有効性が検討され、そのエビデンスは充実しつつある。しかし、その安全性に関する明確なエビデンスはほとんどなく、がん化学療法における副作用の発現と併用される漢方薬との関連性については明らかにされていない。また、併用される漢方薬が抗がん薬の薬効発現や体内動態に及ぼす影響に関する情報は十分に得られていない。

国内外における研究の動向としては、医薬品の体内動態を変動させるメカニズムとして、がん細胞における多剤耐性の原因蛋白質として発見された ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp, MDR1/ABCB1)、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) などの阻害や誘導が報告されており、薬物代謝酵素と同様に、薬物の体内動態に大きく寄与することが示唆されている。Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) は、比較的新しく発見された ABC トランスポーターであり、P-gp などと同様に、その阻害・誘導は薬物の抗がん薬の体内動態の変動要因となる。制吐療法に用いられるステロイド薬の dexamethasone が、P-gp の基質、阻害薬および誘導薬となる可能性が *in vitro* 実験において示されている。しかし、dexamethasone が抗がん薬による治療効果と副作用の発現に及ぼす影響については、明らかにされていない。漢方薬についても、併用される医薬品の体内動態に及ぼす影響は、十分に評価されていない。有効性が期待される医薬品の併用における副作用や相互作用を未然に防ぐために、その安全性評価が必要である。

医薬品の適正使用やリスクマネジメントの観点から、薬物間相互作用に関する情報を把握することは医療従事者にとって非常に重要である。そのためには、医薬品の安全性情報は頻繁に更新され、常に最新化されていることが必要である。本研究の遂行は、がん化学療法における副作用の発現とその重症度に影響を与える可能性がある併用薬を

明らかにし、また、抗がん薬と種々の併用薬について ABC トランスポーターを介した相互作用の可能性を明らかにする。これにより、副作用の増悪や有効性の減弱を招く薬物間相互作用を未然に回避し、がん化学療法における有効性と安全性を確保することが可能になると着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、がん化学療法における薬物間相互作用の可能性を予測し、医薬品使用の安全性を確立することを目的として、抗がん薬と併用薬の使用実態を調査した。また、対象患者の検査値推移、薬歴を調査することにより、併用薬が抗がん薬による副作用の発現に及ぼす影響について疫学的手法を用いて評価した。さらに、併用薬が抗がん薬の ABC トランスポーターを介した薬物輸送やがん細胞への移行性と抗腫瘍効果に及ぼす影響を明らかにするために、*in vitro* 評価系を確立した。

3. 研究の方法

(1) がん化学療法において使用される併用薬の使用実態と安全性に関する疫学調査

① 医薬品使用実態調査

浜松医科大学医学部附属病院においてがん化学療法を施行された全患者を対象として、fluorouracil (5-FU)、carboplatin (CBDCA)、cisplatin (CDDP)、nedaplatin (CDGP)、irinotecan (CPT-11)、docetaxel (DOC)、oxaliplatin (L-OHP)、paclitaxel (PTX) および vincristine (VCR) と、これらの抗がん薬と併用された漢方薬の使用量、各薬剤の併用・非併用患者における臨床検査値推移および副作用の発現の有無とその重症度を調査した。調査には、浜松医科大学医学部附属病院臨床データ検索システム（臨床研究 DB システム）、外来がん化学療法支援システム（宮本ら、日本病院薬剤師会雑誌. 43: 1222-6, 2007）および患者カルテを用いた。調査期間は、2007 年 1 月 1 日から 2010 年 12 月 31 日の 4 年間とした。薬効分類と測定単位は、Anatomical Therapeutic Chemical Classification System and Defined Daily Dose (ATC/DDD) に準じた。ATC で分類されていない場合は、調査施設における標準的な維持用量である Prescribed Daily Dose を用いた。また、漢方薬については、DDD の概念をベースとして日本における医療用漢方薬の仮想 1 日平均維持量を表す

Kampo Defined Daily Dose の方法論に従った。

②副作用発現の評価

副作用の発現とその重症度は、Common Terminology Criteria for Adverse Events ver. 4.0 (CTCAE v4.0) により評価した。各臨床検査値について、CTCAE v4.0 における grade 1 以上の患者を検査値異常発現ありとした。

③統計解析

有意水準を 5% として、Fisher's exact test (extended) を行った。

④倫理的配慮

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に従い、金沢大学と浜松医科大学における医学倫理審査委員会の承認を受けて実施した。

(2) *In vitro* 実験

①細胞培養

ブタ腎由来 LLC-PK1、ヒト MDR1 を過剰発現した LLC-GA5-COL150 (Tanigawara et al., *J Pharmacol Exp Ther* 263: 840-845, 1992)、ヒト BCRP を過剰発現した BCRP-overexpressing LLC-PK1 (Takada et al., *Drug Metab Dispos* 33: 905-909, 2005)、ヒト結腸がん由来 Caco-2 およびヒト乳がん由来 MCF-7 は、それぞれ 10% fetal bovine serum (FBS) を含む medium 199 (M199)、M199 に 10% FBS と 150 ng/mL colchicine を添加した培地、10% FBS と 400 µg/mL G418 sulfate を含む M199、10% FBS、1% non-essential amino acids (NEAA)、100 U/mL penicillin G および 10 mg/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle medium、10% FBS、1% NEAA および 2 mM L-glutamine を含む Minimum essential medium eagle を用いて、5% CO₂、37°C 条件下において常法に従い継代培養した。

②P-gp を介した薬物輸送実験

24 well multi dish で 3 日間培養された LLC-PK1 と LLC-GA5-COL150 を用いて、阻害薬の存在・非存在下で LLC-GA5-COL150 における P-gp の基質である rhodamine123 または [³H]digoxin の細胞内取り込み量を測定した。P-gp 阻害薬として verapamil と SDZ-PSC833 を使用した。

③経細胞輸送実験

TranswellTM で 21 日間培養された Caco-2 細胞単層膜を用いて、[³H]digoxin の経細胞輸送量を測定した。

④MRP2 と BCRP を介した薬物輸送実験

膜ベシクルは、ヒト MRP2 を過剰発現した昆虫由来 Sf9 (MRP2-overexpressing Sf9) と green fluorescent protein をコードしたバキュロウイルスに感染させた Sf9 (vector-transfected Sf9)、BCRP-overexpressing LLC-

PK1 とベクターのみを導入した LLC-PK1 (vector-transfected LLC-PK1, Takada et al., *Drug Metab Dispos* 33: 905-909, 2005) から、Müller らと Ito らの方法に従ってそれぞれ調製した (Müller et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13033-13037, 1994; Ito et al., *Mol Pharmacol* 59: 1077-1085, 2001)。調製した膜ベシクルは液体窒素を用いて凍結し、使用するまで -80°C で保存した。MRP2 過剰発現膜ベシクルと BCRP 過剰発現膜ベシクルを用いて、膜ベシクル内取込み実験を行った。急速濾過法を用いて、MRP2 または BCRP 阻害薬の存在・非存在下で MRP2 と BCRP の基質である [³H]estradiol 17-β-D-glucuronide (E₂17βG) それぞれの ATP に依存した膜ベシクル内取込み量を測定した。

⑤細胞生存活性の測定

96 well multi dish で 24 時間培養された LLC-PK1、LLC-GA5-COL150 または BCRP-overexpressing LLC-PK1 を用いて、併用薬の存在・非存在下における抗がん薬曝露時の細胞生存活性を MTT assay により測定し、併用薬が抗がん薬の細胞増殖能抑制作用に及ぼす影響を評価した。抗がん薬として、DXR と MIT を使用した。

⑥ABCBI と ABCG2 mRNA 発現量の測定

種々の抗がん薬の存在・非存在下で培養した MCF-7 における ABCBI mRNA と ABCG2 mRNA 量を real time RT-PCR 法により測定した。抗がん薬として、aclerubicin (ACR)、bortezomib (PS-341)、DOC、doxorubicin (DXR)、mitoxantrone (MIT)、PTX、trastuzumab (TRA) および vinorelbine (VNR) を用いた。それぞれの抗がん薬の存在下で 48 時間培養された MCF-7 から得られた cDNA サンプルを使用した。得られた cDNA は -85°C で保存した。

⑦統計解析

得られた測定値から平均値とその標準誤差を算出した。統計解析では、Bonferroni's multiple t-test を行い、統計的有意性の有無を危険率 5% および 1% 以下によって検定した。IC₅₀ はプロビット法を用いて算出した。

4. 研究成果

(1) がん化学療法における医薬品使用実態調査

浜松医科大学医学部附属病院の全入院患者を対象に、抗がん薬と併用された漢方薬の使用量について、臨床研究 DB システムを用いて調査した。その結果、5-FU、CBDCA、CDDP、CDGP、CPT-11、DOC、L-OHP、PTX および VCR を使用した患者のうち、それぞ

れ 37 (14.4%)、63 (21.6%)、59 (13.1%)、6 (10.3%)、52 (54.2%)、27 (12.7%)、16 (30.8%)、48 (25.1%) および 33 (12.9%) 名において漢方薬が併用された。これらの抗がん薬と併用された漢方薬は 26 製剤であり、その使用量の約 8 割を大建中湯 (22.4%)、半夏瀉心湯 (16.9%)、牛車腎気丸 (13.9%)、十全大補湯 (13.1%) および芍薬甘草湯 (13.1%) が占めた。

抗がん薬と漢方薬が併用された組み合わせは、CPT-11 と半夏瀉心湯 (34 名)、CBDCA と大建中湯 (20 名)、PTX と牛車腎気丸 (18 名) の順に多かった。

CPT-11 と半夏瀉心湯を例に、抗がん薬と漢方薬との併用実態を詳細に調査した結果、CPT-11 施行患者の約半数が半夏瀉心湯を併用していることが明らかになった。CPT-11 の使用は、経年的に増加していたのに対し、半夏瀉心湯の使用は、2009 年において前年の約 66% に減少し、2010 年には前年の約 210% (2008 年の約 140%) に増加していた。一方、CPT-11 と半夏瀉心湯との併用は、経年的に増加し、2009 年以降は半夏瀉心湯の全使用のうち 80% 以上が CPT-11 と併用されていた。CPT-11 と半夏瀉心湯が併用されていた診療科は、主に、消化器内科と呼吸器内科であった。CPT-11 を用いたがん化学療法において、CPT-11 の投与量と半夏瀉心湯の併用率に有意な相関は認められなかった。CPT-11 施行患者における下痢の発現の指標としてロペラミド塩酸塩製剤 (LPR) の併用実態を調査した結果、半夏瀉心湯併用の有無と LPR の併用の有無に有意な関連性は認められなかった。

漢方薬併用時の有害事象の発現の有無を調査した結果、PTX または CPT-11 を使用した患者において Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 の grade 3 以上の血小板減少の発現と大建中湯または半夏瀉心湯の併用にそれぞれ有意な関連性が認められた他、一部の漢方薬の併用が骨髄抑制、電解質代謝異常、肝機能検査値異常等の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) ABC トランスポーターを介した薬物間相互作用の予測—*in vitro* 評価系の確立

①ABC トランスポーターを介した薬物輸送に及ぼす影響の評価

P-gp を介した薬物輸送を評価するために、LLC-PK1 と LLC-GA5-COL150 における P-gp 基質の細胞内取り込み量を比較した。LLC-GA5-COL150 における rhodamine123 と [³H]digoxin の細胞内取り込み量は、LLC-PK1

に比べて、それぞれ有意に減少した。P-gp 阻害薬である verapamil と SDZ-PSC833 存在下における P-gp 基質の細胞内取り込み量は、LLC-PK1 と LLC-GA5-COL150 において同程度まで増加した。本実験系を用いることにより、併用薬が P-gp を介した薬物輸送に及ぼす影響を評価できることが確認された。また、Caco-2 単層膜における [³H]digoxin と [¹⁴C]inulin の経細胞輸送量を評価することにより、併用薬がヒト消化管における薬物輸送に及ぼす影響を評価できることを確認した。さらに、MRP2 と BCRP の特異的基質である [³H]E₂17βG などを用いて、P-gp と同様に細胞内取り込み実験や経細胞輸送実験を試みたが、その高い水溶性のために、細胞系での MRP2 または BCRP による薬物輸送は評価できなかった。そこで、膜ベシクルを用いた実験系を本研究に適用した。Vector-transfected Sf9 から調製した膜ベシクルと MRP2-overexpressing Sf9 から調製した膜ベシクルにおける ATP に依存した [³H]E₂17βG の膜ベシクル内への取り込み量を測定することにより、併用薬が MRP2 を介した薬物輸送に及ぼす影響を評価できることが確認された。また、Vector-transfected LLC-PK1 から調製した膜ベシクルと BCRP-overexpressing LLC-PK1 から調製した膜ベシクルにおける ATP に依存した [³H]E₂17βG の膜ベシクル内への取り込み量を測定することにより、併用薬が BCRP を介した薬物輸送に及ぼす影響を評価できることが確認された。

②がん細胞増殖能に及ぼす影響の評価

併用薬が ABC トランスポーターの基質となる DXR と MIT の薬効発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、P-gp と BCRP がそれぞれ過剰発現した細胞、LLC-GA5-COL150 と BCRP-overexpressing LLC-PK1 を用いて、DXR と MIT の細胞増殖抑制作用に及ぼす影響を評価した。併用薬非存在下、DXR または MIT 曝露時の LLC-GA5-COL150 における細胞生存活性は、それぞれ 10 μM までの濃度では低下が見られなかったことから、LLC-GA5-COL150 では P-gp が過剰に発現しており、DXR と MIT の細胞外排出が亢進していることが示された。併用薬非存在下、DXR と MIT 曝露時の BCRP-overexpressing LLC-PK1 における細胞生存活性は、LLC-PK1 に比べ増大し、LLC-PK1 に比べ BCRP-overexpressing LLC-PK1 では BCRP が過剰に発現しており、DXR と MIT の細胞外排出が亢進していることが示された。P-gp の阻害薬である verapamil、SDZ-PSC833 または cyclosporin A 存在下の

LLC-PK1におけるDXRとMIT曝露時の細胞生存活性は、阻害薬非存在下と比べ変化は見られなかった。一方、それぞれの阻害薬存在下において、LLC-GA5-COL150におけるDXRとMIT曝露時の細胞生存活性は、阻害薬非存在下と比べて低下した。本実験系を用いることにより、ABCトランスポーターを阻害する可能性のある併用薬が抗がん薬の抗腫瘍効果に及ぼす影響を評価できることが確認された。

③P-gpとBCRPの発現に及ぼす影響の評価

抗がん薬と併用薬がP-gpとBCRPの発現に及ぼす影響を評価するために、各細胞における*ABCB1* mRNAと*ABCG2* mRNAの発現量を測定した。LLC-GA5-COL150における*ABCB1* mRNAの発現量は、LLC-PK1における発現量の約1,000倍であった。抗がん薬の非存在下で48時間培養されたMCF-7において、*ABCB1* mRNAの発現は見られなかったが、PS-341存在下で48時間培養されたMCF-7において、real time PCRによる増幅産物が見られ、*ABCB1* mRNAの誘導が確認された。10、50および100 nM DXRの存在・非存在下で48時間培養されたMCF-7の*ABCG2* mRNA発現量をDXR非存在下で培養されたMCF-7と比較した結果、濃度依存的に増加する傾向が見られたが、DXRがMCF-7における*ABCG2* mRNAの発現に及ぼす影響は小さい可能性が示唆された。今後、mRNAだけでなく、実際にABCトランスポーターの発現が誘導されているかどうかを明らかにするために、western blotやflow cytometryなどを行い、ABCトランスポーターの発現を確認する必要がある。また、誘導されたABCトランスポーターの機能を評価するために、抗がん薬による前処理をされた細胞を用いて、基質となる薬物の細胞内取り込み量を確認する必要がある。

今後は、本研究において検討された*in vitro*評価系等を用いて、副作用の発現に影響を及ぼす可能性が示唆された併用薬について、そのメカニズムを解明したい。さらに、併用薬が抗がん薬の体内動態や、がん細胞への移行性と抗腫瘍効果に及ぼす影響を明らかにし、がん化学療法における相互作用の可能性を予測することにより、漢方薬併用時の安全性を確保したい。また、得られた研究成果を、随時学会または学術雑誌において発表し、医薬品使用の安全性に関するエビデンスを提供していきたい。

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)

[学会発表] (計1件)

- ① 吉田直子, 堀雄史, 木村和子, 大西一功, 川上純一: がん化学療法におけるイリノテカンと半夏瀉心湯の併用実態と副作用発現との関連性の評価. 第31回日本臨床薬理学会年会, 2010年12月1日. 国立京都国際会館(京都府)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 直子 (YOSHIDA NAOKO)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号: 20565428

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし