

# 小児がん患者の QOL 向上を目指した 支持療法の最適化に関する研究

齋藤 義正

2017 年 1 月

# 博 士 論 文

## 小児がん患者の QOL 向上を目指した 支持療法の最適化に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

薬学専攻

薬物動態学研究室

学 籍 番 号      1228052002

氏                      名      齋藤 義正

主任指導教員名      玉井 郁巳

## 目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	イホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法の提案	9
第 1 節	小児または若年成人に対するメスナ及び大量輸液による出血性膀胱炎予防	11
第 2 節	イホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子の評価と予防法への応用	18
第 3 節	小括	22
第 3 章	シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法の提案	23
第 1 節	小児または若年成人に対するメスナ及び大量輸液による出血性膀胱炎予防	25
第 2 節	シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の予防法の検討	32
第 3 節	小括	37
第 4 章	イリノテカン誘発性消化管毒性に対する新規毒性回避方法の提案	38
第 1 節	OATP2B1 を介した SN-38 の輸送特性の評価	42
第 2 節	イリノテカンによる遅発性下痢に対する予防薬の OATP2B1 阻害効果	47
第 3 節	果汁による SN-38 の OATP2B1 輸送阻害	51
第 4 節	小括	54
第 5 章	結論	56
第 6 章	実験方法	59
第 7 章	引用文献	62
第 8 章	謝辞	80

略語一覽

語句略語	語句略語内容
ABC	ATP-binding cassette
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCRP	breast cancer resistance protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFIX	cefixime
CYP	cytochrome P450
CPT-11	irinotecan
eGFR	estimated glomerular filtration rate
MRP2	Multidrug resistance associated protein 2
OATP	organic anion transporting polypeptide
P-gp	p-glycoprotein
PD	pharmacodynamics
PK	pharmacokinetics
QOL	quality of life
SN-38	7-ethyl-10- hydroxy-camptothecin
UGT	UDP-glucuronosyltransferase

## 第 1 章 序論

悪性新生物による死亡率は、昭和 56 年に死因順位の第 1 位になってから増加傾向が続き、平成 27 年の全死亡患者に占める割合は 28.7%に達している。本邦における死因の変化は急速な高齢化が要因となっているが、20 歳未満の死亡原因に注目すると悪性新生物が常に小児の死因の上位に位置していることが問題となる (Table 1-1)。

Table 1-1 小児の主な死亡原因。

年 齢	第 1 位	第 2 位	第 3 位	第 4 位	第 5 位
0	先天奇形等	呼吸障害等	乳幼児突然死症候群	出血性障害等	不慮の事故
1～4	先天奇形等	不慮の事故	悪性新生物	心 疾 患	肺 炎
5～9	悪性新生物	不慮の事故	先天奇形等	心 疾 患	肺 炎
10～14	悪性新生物	自 殺	不慮の事故	先天奇形等	心 疾 患
総 数	悪性新生物	心 疾 患	肺 炎	脳血管疾患	老 衰

(平成 27 年度 人口動態統計 死亡順位別死亡数・死亡率, 性・年齢別より一部抜粋して転載)

小児がんは 15 歳以下の子どもに発症する悪性新生物の総称である。年間発生数が人口 10 万人あたり 6 例未満の悪性腫瘍は希少がんと定義されるため [Surveillance of Rare Cancers in Europe, <http://www.rarecare.eu/default.asp> (2017 年 11 月 26 日参照)], 毎年の罹患数が約 2000-2500 人の小児がんは希少がんの集まりということになる。成人がん和小児がんの違いは、成人では粘膜や皮膚の表層から発生する上皮性の癌腫が多いのに対し、小児固形がんではほとんどが胎児性組織に由来した芽腫や肉腫が多い。肉腫の発生母地となる組織は体中のいたる所に存在するため、筋肉、骨、神経など、体中のどこからでも発生するのが特徴である。そのため、小児がんは発生臓器別ではなく、病理組織学的に名付けられている。国

際小児がん分類によると、主分類で12種類（白血病、悪性リンパ腫、中枢神経系腫瘍、神経芽腫などの末梢神経腫瘍、網膜芽腫、腎腫瘍、肝腫瘍、悪性骨肉腫、軟部肉腫、胚細胞性腫瘍、上皮性腫瘍や黒色腫、分類不能な腫瘍）、小分類で47種類に分類される<sup>1)</sup>。小児がんは成人がんと比較して患者数が圧倒的に少なく、そのため細分化された疾患群において新規治療法を開発することは容易ではない。

小児固形がんに対する治療戦略は、化学療法による全身療法、放射線治療、外科治療による局所療法を組み合わせた集学的治療が中心となる。骨肉腫の場合、遠隔転移がなくても手術のみの治療では2年無生存割合が15-20%と予後不良であったが、1980年代に行われた手術単独療法と術後補助化学療法を比較した第Ⅲ相試験によって、術後補助化学療法の有効性が示されている<sup>2)</sup>。横紋筋肉腫の場合、局所腫瘍制御を最大化するため集学的治療が必要となる<sup>3-5)</sup>。その他、複数の癌腫において術後補助化学療法の有効性が示され、小児がんの治療では化学療法は必要不可欠である<sup>6)</sup>。小児がんの治療成績は向上し、全体として約80%は治癒するようになっている<sup>7)</sup> (Fig.1-1)。

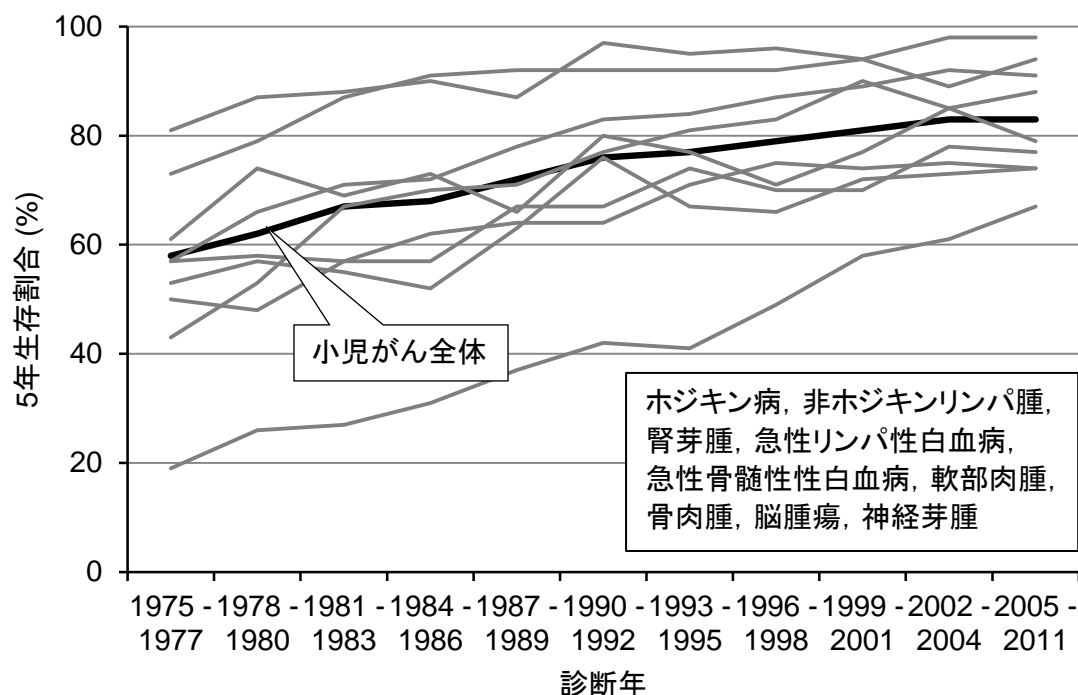


Fig.1-1 Trends in 5-year relative survival rates (%) for children by year of diagnosis, United States, 1975 to 2011

(引用文献 7 から転載)

神経芽腫の治療成績は徐々に向上している。国際神経芽腫病期分類 (INNS) ごとの治療成績を比較すると stage 1-3 では 10 年生存で約 90% 以上の成績が期待できるようになっている<sup>8)</sup>。しかし、米国での stage 4 の治療成績は約 30% であるが、本邦では欧米で利用可能な医薬品が承認されていないため、治療成績はさらに低いと考えられる (Fig. 1-2)。本邦における総合的な対がん研究は、昭和 59 年度に対がん 10 ヵ年総合戦略として始まり、平成 6 年度からはがん克服新 10 ヵ年戦略、平成 16 年度からは第 3 次対がん 10 ヵ年総合戦略、及びそれに引き続き平成 26 年度からはがん研究 10 ヵ年戦略を定め、がん研究の総合的かつ計画的な取り組みが行われている。この研究戦略には、アンメットメディカルニーズに応える新規薬剤開発に関する研究やライフステージやがんの特性に着目した重点研究領域があり、希少がんや小児がんなどの治療法開発が取り上げられている。

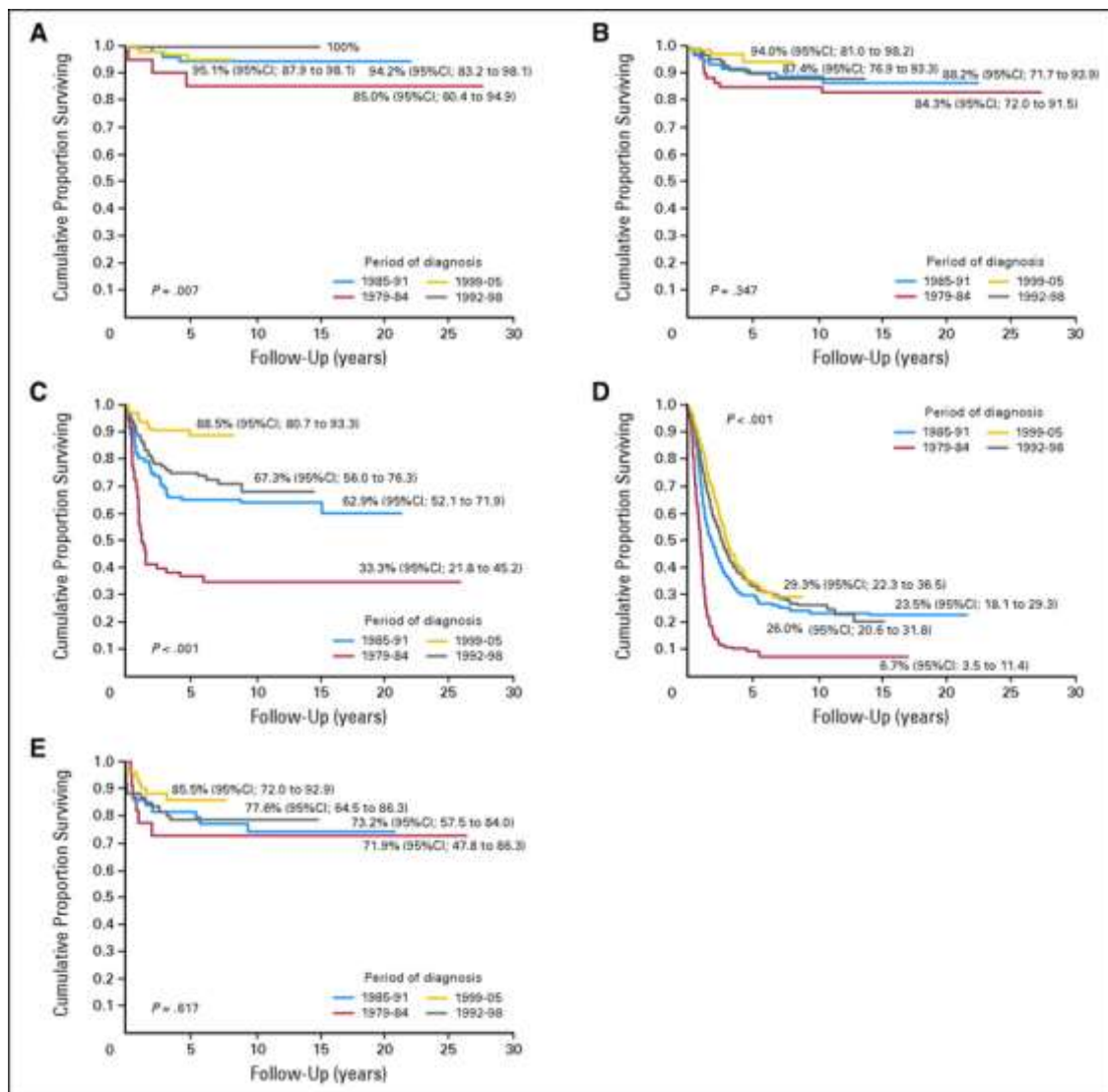


Fig. 1-2 Ten-year overall survival by stage and enrollment period.

(A) Stage 1; (B) stage 2; (C) stage 3; (D) stage 4, (E) stage 4S

(引用文献 8 から転載)



小児は成人に向けての成長過程であるため、年齢によって体重や薬物動態などが多様であり、化学療法だけでなく支持療法についても個別の対応が必要である。新生児の胃酸分泌量は少なく、胃内 pH は中性に近いが、2-3 歳くらいまでには成人値に達する<sup>9)</sup>。新生児では胃内容排泄速度が遅く、アセトアミノフェンの吸収は胃内容排泄速度の影響を受けることが報告されている<sup>10)</sup>。新生児の血清アルブミン値は成人の 75-80%、 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質は成人の約 50%に相当するため、タンパク結合率は成人よりも低く、年齢とともに徐々に増加することが知られている<sup>11)</sup>。

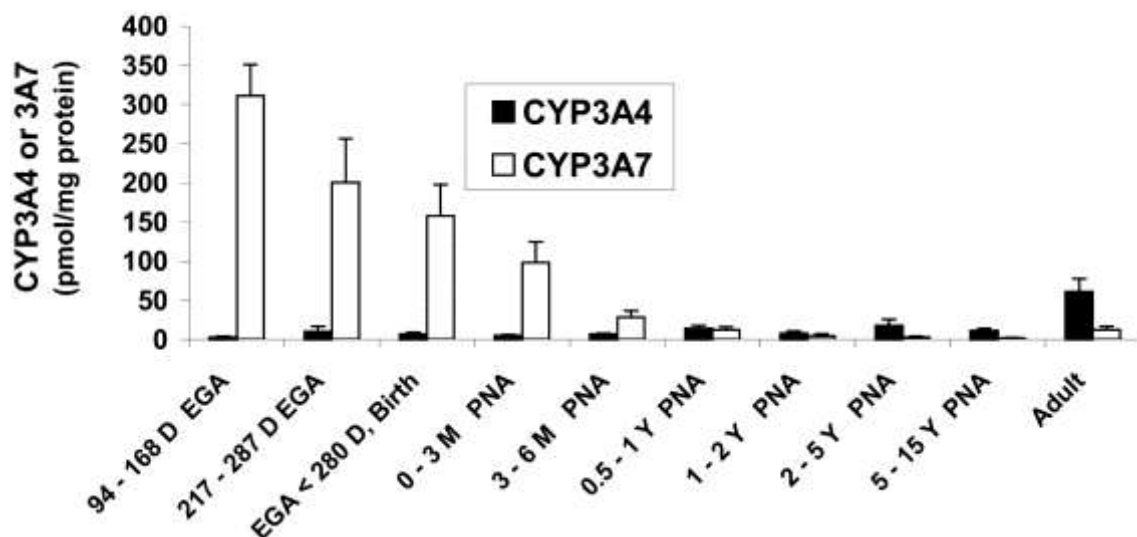


Fig. 1-3 Age-dependent expression of CYP3A4 and -3A7

EGA, estimated gestational age; PNA, postnatal age

(引用文献 13 から転載)

肝代謝型薬物の肝代謝クリアランスは、肝体積と肝組織中の酵素活性が重要となる。代表的な薬物代謝酵素である cytochrome P450 (CYP) は、肝臓に数十種類の分子種が存在しているが、胎児肝では CYP の構成分子種が成人肝と異なる。胎児肝では CYP3A7 が主要な CYP 分子種であるが、生後に発現が減少し成人ではほとんど見られなくなる<sup>12)</sup>。一方、成人肝の主要な分子種の一つである CYP3A4 は胎児肝ではほとんど発現していないが、生後 1 年間

で急速に増加する<sup>13)</sup> (Fig. 1-3)。腎組織におけるネフロン形成は胎児期の早期から始まり、妊娠 34-36 週にはネフロンの形成は完了する<sup>14)</sup>。そのため糸球体濾過速度 (GFR: glomerular filtration rate) は、生後 2 週間の間に急速に発達し、1 歳になるとほぼ成人レベルに達する<sup>15)</sup> (Fig. 1-4)。

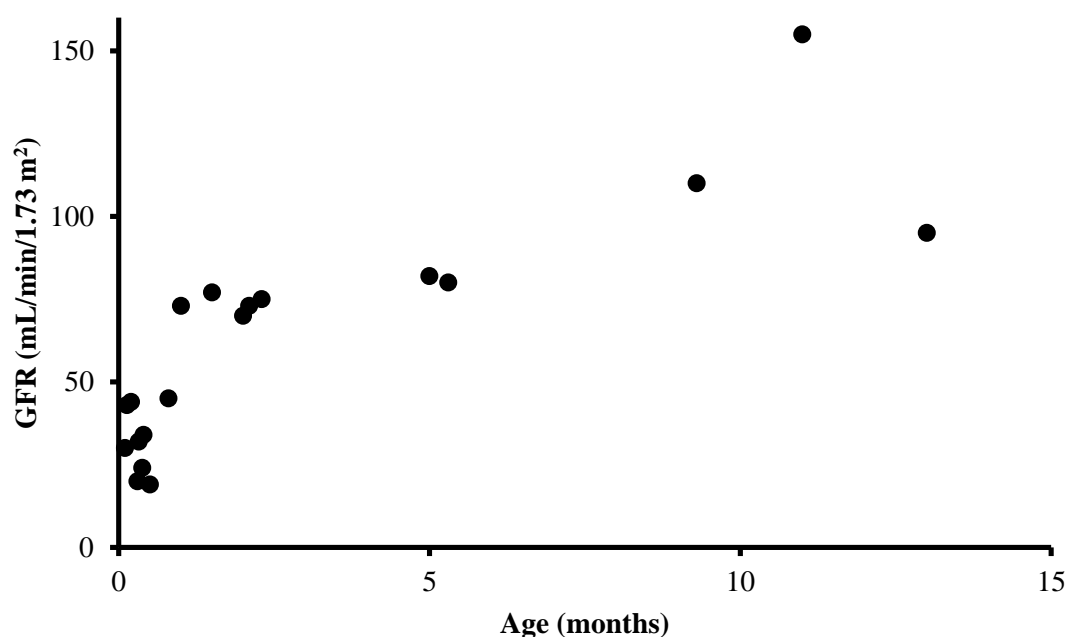


Fig. 1-4 GFR during first year of life

(引用文献 15 から転載)

このように薬物投与後の体内動態のうち、吸収、分布、代謝、排泄の各過程で生理的発達段階に応じた変化がみられる。内服薬の場合には、子どもが飲みやすい、家族が飲ませやすいことも重要な要素である。したがって、個々の薬物の体内動態は年齢とともに大きく変化するため、投与量だけでなく、適正な剤形、デバイス、投与経路などを合わせて考慮する必要がある。しかし、そのために必要な医薬品がなかなか開発されず、臨床では、錠剤の粉碎、脱カプセル、または簡易懸濁法などを用いるが、投薬することを優先するため、患児の嗜好性の面で課題が残る。また、既存の医薬品については小児に対する用法用量が明確ではないも

のが存在しているのが現状である。

抗悪性腫瘍薬は一般的に有効域と毒性域の差が小さく (Fig. 1-5)、有効性を期待する用量でも重篤な副作用を発現するため、支持療法の同時開発が必要である。がん医療における支持療法とは、がん随伴症状の管理、およびがん治療の有害事象の発生予防と管理と定義され [Multinational Association of Supportive Care in Cancer, <http://www.mascc.org/> (2017年11月26日参照)]、がんの診断から治療を経て治療後のケアまでの一連の過程を通して、身体的および精神心理的な症状や副作用のマネジメントが含まれている。したがって、小児がん治療における支持療法の開発は、患児と家族の生活の質 (QOL: quality of life) の向上という視点から必須である。

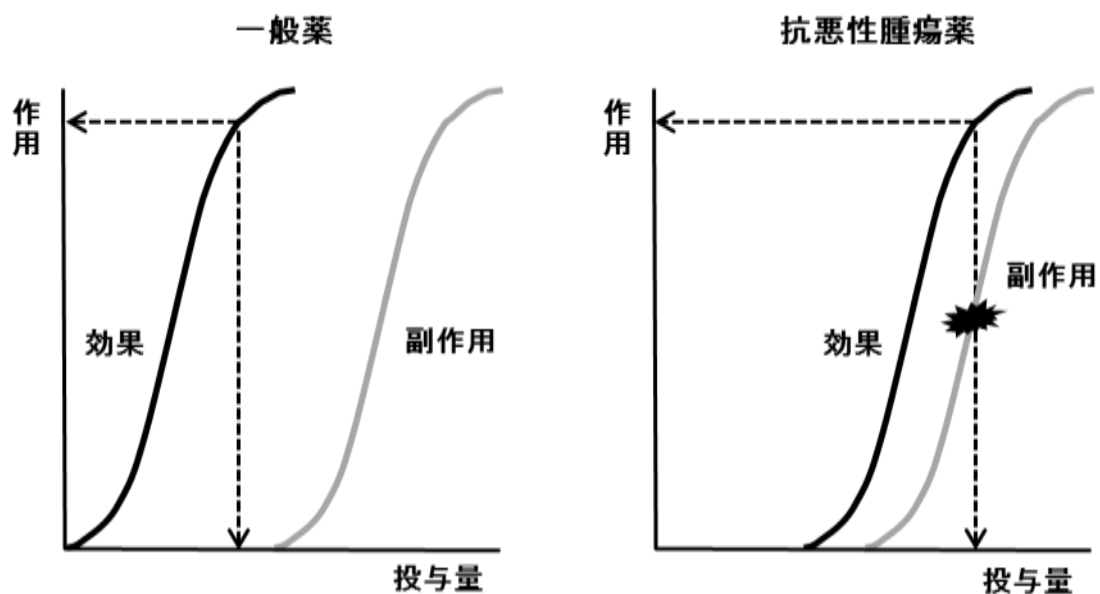


Fig. 1-5 Dose-response curve for anticancer agents

抗悪性腫瘍薬には、作用機序や由来などによって細胞障害性抗がん薬と分子標的薬に大別できる。細胞障害性抗がん薬は、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤などに分類されるが、どの医薬品も細胞の分裂機構に作用し、細胞増殖を抑える。したがって、脱毛や骨髄など増殖速度が大きい正常組織で副作用がみられる。一方、分子標的治療薬は、癌細胞が持つ特定の遺伝子やタンパク質を標的として作用するため、細胞障害性抗がん薬とは異なる副作用プロファイルを持つことが特徴である。手足皮膚反応やざ瘡様皮疹などの皮膚症状や高血圧など、従来にはなかった重篤な副作用が発現することもあるため、分子標的治療薬特有の支持療法が必要である。また、抗悪性腫瘍薬による副作用は、治療中だけでなく、治療終了後に発現することもあり<sup>16)</sup>、医薬品に特徴的な副作用を把握し、長期にわたり適切に管理することが求められる。

実臨床では、多くの支持療法薬が用いられているが、成人領域では化学療法に伴う悪心・嘔吐など一部の分野を除き大規模な臨床試験によるエビデンスは乏しく、小児領域ではその困難さは成人の比ではない。小児がん化学療法を受けるすべての患者に対して適切な支持療法を行うためには、経験的な少数例の検討を積み重ね、実臨床に応用していくことも重要である。また、支持療法薬を選択する際には、療養生活と学業の両立を希望することが多く、支持療法薬の投与経路や副作用プロファイルなどを考慮し、複数の支持療法薬の中から希望に沿った支持療法を選択することも必要となる。

小児がん化学療法では、利用できる分子標的治療薬が限られ、細胞障害性抗がん薬による治療が主体となっている。イホスファミドとシクロホスファミドによる出血性膀胱炎の支持療法は小児に対するエビデンスが乏しく、イリノテカンによる遅発性下痢対策は、支持療法薬による副作用やアドヒアランスが問題となる。これらの問題を解決するために本研究では、第 2 章ではイホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法、第 3 章ではシクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法、第 4 章ではイリノテカン誘発性消化管毒性に対する新規毒性回避方法について検討し、第 5 章に結論としてまとめた。

## 第2章 イホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法の提案

イホスファミドは、小児固形がんの治療に必要不可欠な抗がん薬の一つとして、単剤あるいは他剤との併用で用いられている<sup>17-22)</sup>。イホスファミドはプロドラッグであるため、主に肝代謝酵素 CYP3A4 によって代謝され、活性化された代謝物が抗腫瘍効果を発揮する。イホスファミドの代謝経路は Fig. 2-1 に示す。最終代謝産物の一つとして強い尿路障害性を有するアクロレインが生成する<sup>23)</sup>。アクロレインは、 $\alpha, \beta$ -不飽和アルデヒドであるため反応性が高く、尿路上皮細胞に取り込まれ求核付加反応を起こす<sup>24)</sup>。出血性膀胱炎はイホスファミドの用量規制毒性になるため、イホスファミドを含む治療を実施する際には 2-メルカプトエタンスルホン酸 (メスナ) 投与などの予防策を講じる必要がある<sup>25)</sup>。

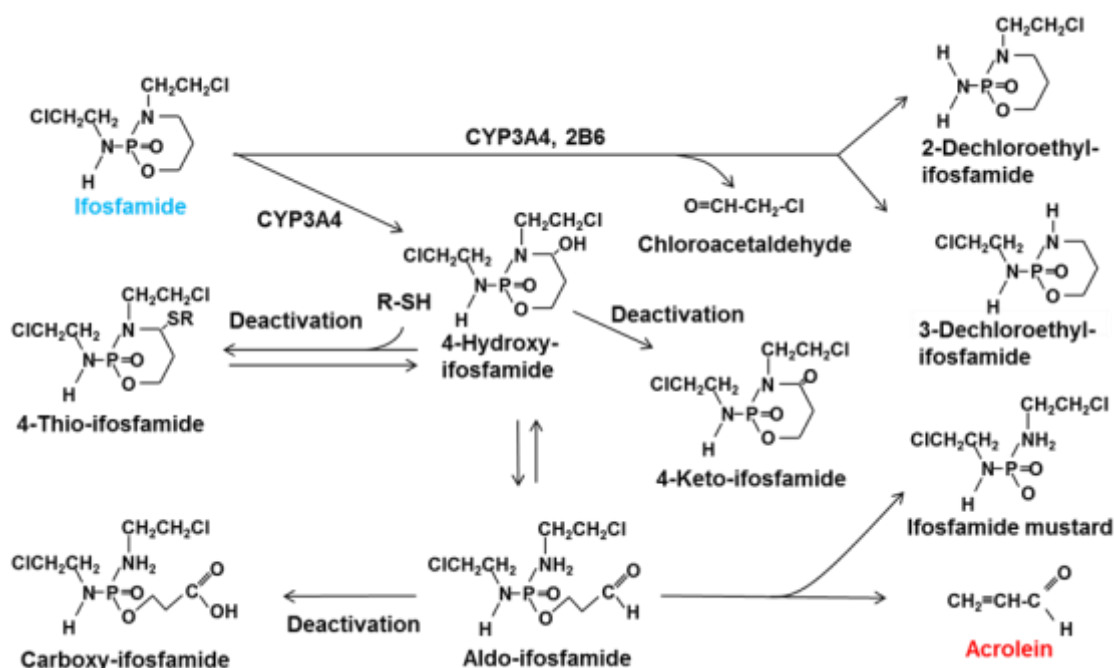


Fig. 2-1 Metabolism of ifosfamide

メスナは生体内で酸化されて二量体であるジメスナを形成する。ジメスナは尿細管で還元されメスナとして尿中に排泄され、アクロレインと結合しイホスファミドの毒性を軽減する<sup>25)</sup>。メスナによる出血性膀胱炎の予防を行わずにイホスファミドを投与した場合、20-40%に出血性膀胱炎が発現する可能性がある<sup>26)</sup>。イホスファミド投与時には、出血性膀胱炎を予防するためにメスナ投与と大量輸液による強制利尿を実施することが米国臨床腫瘍学会（ASCO: American Society of Clinical Oncology）のガイドラインに示されている<sup>27)</sup>。イホスファミド1日投与量が $2.5\text{ g/m}^2$ 以下の場合には、イホスファミドの1日相当量の20%量のメスナをイホスファミド投与時およびその4、8時間後に投与することが推奨されている。しかし、イホスファミド1日投与量が $2.5\text{ g/m}^2$ を超える場合には、メスナ投与量について十分なエビデンスがない。また、ガイドラインは成人を対象とするため、小児に対する予防法については言及されていない。

出血性膀胱炎は、一般的に年齢、血小板減少、造血幹細胞移植、骨盤部への放射線照射、BK ウィルスへの感染などが危険因子と考えられている<sup>28-31)</sup>。しかし、イホスファミドによる出血性膀胱炎の特異的な危険因子や予防法、さらに小児がん患者を対象とした場合の情報は限られている<sup>31-33)</sup>。

本章では、イホスファミドを投与された小児から若年成人を含む固形がん患者を対象にレトロスペクティブに出血性膀胱炎の危険因子や最適な支持療法について検討した。若年成人について明確な定義はないが、小児と同様に患者数が少なく、小児がんと成人がんの境界領域となるため対象に含めて検討した。

## 第 1 節 小児または若年成人に対するメスナ及び大量輸液による出血性膀胱炎予防

### (1) 対象と方法

2010 年 1 月から 2014 年 12 月までに国立がん研究センター中央病院小児腫瘍科において、イホスファミドを含む化学療法が開始された 30 歳未満の固形がん患者 70 名を対象とした (Table 2-1)。造血器腫瘍患者は病態として易出血状態になることもあるため除外した。小児は 15 歳未満、若年成人は 15 歳から 30 歳未満と定義し、年齢によって層別化 (小児: 15 歳未満、若年成人: 15 歳から 30 歳未満) を行った。患者背景 (がん種、性別、年齢)、イホスファミド投与量、メスナ投与量、輸液の流量、血清クレアチニン値、骨盤への放射線照射の有無、出血性膀胱炎の発現や発現期間など解析に必要な情報を電子カルテから収集した。BK ウィルス感染は出血性膀胱炎の危険因子となるが、実臨床で測定を行っていないため調査項目に含めなかった。各調査項目は、化学療法開始前の情報で直近のものとし、サイクル毎に評価した。イホスファミド投与量 ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) は、各サイクル開始時の体表面積と実際の投与量から再計算し、体表面積の算出には Mosteller 式を用いた<sup>34)</sup>。

Table 2-1 Patient characteristics

	Number of patients (n = 70)		Total chemotherapy cycles (n = 425)	
	No.	%	No.	%
Sex				
Male	38	54	200	47
Female	32	46	225	53
Age <sup>a</sup> (years)				
Median			14	
range			1–29	
Diagnosis				
Ewing sarcoma	21	30		
Osteosarcoma	14	20		
Rhabdomyosarcoma	10	14		
Neuroblastoma	8	11		
Others	17	24		
IFO-based chemotherapy				
VDC-IE <sup>b</sup>			114	27
IE			88	21
TI			68	16
IFO			37	9
AI			34	8
VIE			30	7
VIDE			23	5
Others			31	7
Incidence of HC				
All grades	9	13	14	3

<sup>a</sup>, age at first cycle of chemotherapy

<sup>b</sup>, number of cycles of IE chemotherapy

IE, ifosfamide + etoposide; VDC-IE, vincristine + doxorubicin + cyclophosphamide alternating with ifosfamide + etoposide; TI, topotecan + ifosfamide; IFO, ifosfamide; AI, doxorubicin + ifosfamide; VIE, vincristine + ifosfamide + etoposide; VIDE, vincristine + ifosfamide + doxorubicin + etoposide; HC, Hemorrhagic cystitis



Table 2-2 Grading system for hemorrhagic cystitis

Severity score	Description
Grade 1	microscopic hematuria
Grade 2	macroscopic hematuria
Grade 3	macroscopic hematuria with small clots
Grade 4	gross hematuria with massive clotting causing urinary tract obstruction and requiring instrumentation for clot evacuation

出血性膀胱炎は、Droller らの重症度分類の基準 (Table 2-2) に従って判定した<sup>35)</sup>。出血性膀胱炎は、70 例中 9 例 (13%)、425 サイクル中 14 サイクル (3%) でみられ、出血性膀胱炎の発現頻度はこれまでの報告と同程度であった<sup>25, 26)</sup>。出血性膀胱炎の危険因子について検討するため、対象患者を出血性膀胱炎の発現群と非発現群に分類し、両群における調査項目を比較した。調査期間内にイホスファミドを含む 9 つの化学療法レジメンが用いられ、合計 425 サイクルが施行された。各化学療法レジメンにおける標準的なイホスファミド 1 日投与量は、1.2-3.0 g/m<sup>2</sup> であった。ASCO ガイドラインでは、イホスファミド投与量によって最適な支持療法が異なる可能性が示唆されている<sup>27)</sup>。そこで、対象患者をイホスファミド 1 日投与量によって 2 群に分け、両群における調査項目を比較した。出血性膀胱炎発現時の支持療法を調査し、メスナ投与と大量輸液の有効性を評価した。統計学的有意差検定は、群間比較には Fisher's exact test もしくは  $\chi^2$  test、平均値の比較には Student's *t*-test を用い、*P* 値が 0.05 未満のとき、統計的有意差があるものとした。

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い、当院研究倫理審査委員会の承認を得て行った (研究課題番号: 2014-333)。

## (2) 出血性膀胱炎に対する支持療法

イホスファミドによる出血性膀胱炎の予防法として、メスナと大量輸液による強制利尿を行った。メスナは、イホスファミド 1 日投与量の 20% 相当量をイホスファミド投与時、その 4、8 時間後に投与し、輸液はイホスファミド投与期間中 125 mL/m<sup>2</sup>/h の流速で投与した。ただし、夜間の排尿回数が増えると不眠などによる QOL 低下や小児の場合は夜尿の原因ともなるため、3 回目のメスナ投与時に尿潜血や膀胱刺激様症状が見られない場合には、医師の判断で輸液の流速を減らすか輸液を終了し、翌日、イホスファミドを投与する場合には、投与開始前より輸液の流量を増やすか輸液を再開した。輸液の流速変更については情報収集可能な 144 サイクルで評価し、限定された結果ではあるが、現時点で輸液の流速変更と出血性膀胱炎発現との関連性を示唆する結果はみられなかった。今後は、医師の個別の判断ではなく、標準化した支持療法を用いてその有効性を評価する必要がある。

## (3) イホスファミドによる出血性膀胱炎発現の危険因子の評価

イホスファミドによる出血性膀胱炎発現の危険因子を評価するため、化学療法 425 サイクルを出血性膀胱炎の発現群 (n = 14) と非発現群 (n = 411) に分けて背景因子を比較した (Table 2-3)。年齢、性別、イホスファミド 1 日投与量、メスナ投与量、輸液の流量、血小板減少 (グレード 3 または 4) の有無、eGFR (estimated glomerular filtration rate) について比較したところ、出血性膀胱炎発現群でイホスファミド 1 日投与量が有意に高く、その危険因子であることが示唆された。小児と若年成人の患者間で出血性膀胱炎発現に差はみられなかった。出血性膀胱炎発現群には、骨盤内放射線照射を行った症例は含まれていなかった。

Table2-3 Investigation of factors contributing to ifosfamide induced hemorrhagic cystitis

	No HC (n = 411)	HC (n = 14)	<i>P</i> value
Age (years)			
Children (<15 years)	215 (96%)	8 (4%)	0.722
AYA (15–29 years)	196 (97%)	6 (3%)	
Mean ± SD (years)	14.6 ± 6.2	14.7 ± 4.7	0.966
Sex			
Male	192 (96%)	8 (4%)	0.442
Female	219 (97%)	6 (3%)	
IFO dose			
Mean ± SD (g/m <sup>2</sup> )	1.85 ± 0.50	2.23 ± 0.58	0.006
Mesna dose (% of daily IFO dose)			
Mean ± SD (g/m <sup>2</sup> )	84.6 ± 21.2	87.3 ± 24.2	0.641
Flow rate			
Mean ± SD (mL/m <sup>2</sup> /h)	115.2 ± 19.2	116.4 ± 14.5	0.828
Thrombocytopenia n (%)			
Grade 3 and 4	17 (4%)	1 (7%)	0.460
eGFR			
Mean ± SD (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	143.2 ± 37.7	132.1 ± 30.3	0.237

AYA, adolescent and young adult; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HC, Hemorrhagic cystitis; IFO, ifosfamid

出血性膀胱炎発現とイホスファミド 1 日投与量の関係を Fig. 2-2 に示す。出血性膀胱炎の発現群 (n = 14) と非発現群 (n = 411) におけるイホスファミド 1 日投与量の平均値は、それぞれ  $2.23 \pm 0.58 \text{ g/m}^2$  と  $1.85 \pm 0.50 \text{ g/m}^2$  で有意な差がみられた ( $P < 0.01$ )。これ以上の症例集積は困難であったため、多変量解析を行わず単変量解析のみを行った。

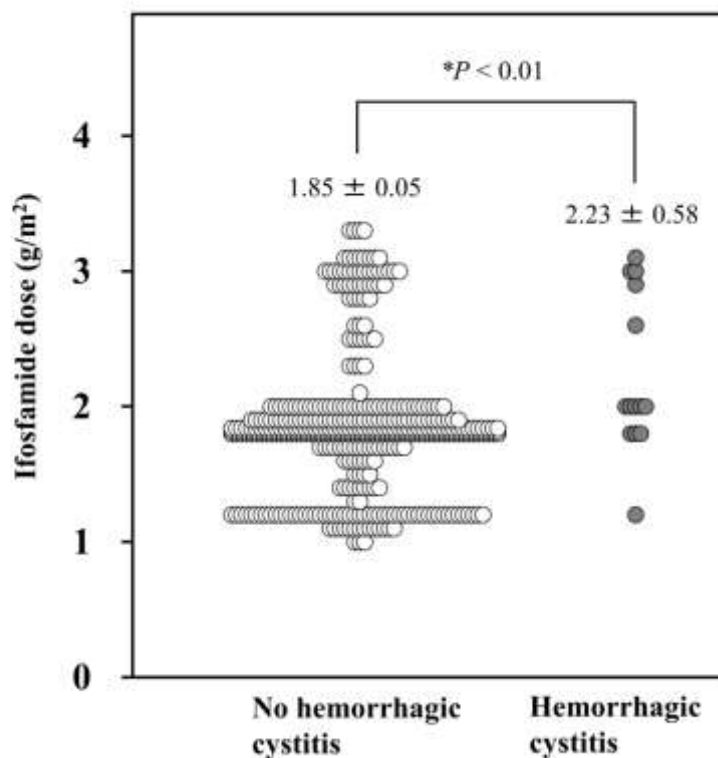


Fig. 2-2 Effect of ifosfamide dose on incidence of hemorrhagic cystitis

Ifosfamide dose in no-hemorrhagic cystitis (n = 411) and hemorrhagic cystitis groups (n = 14) presented as mean  $\pm$  SD

\* indicates a significant difference between the groups ( $P < 0.01$ )

次に、イホスファミド 1 日投与量  $2 \text{ g/m}^2$  を基準に  $2 \text{ g/m}^2$  以下 (SD-IFO 群,  $n = 362$ ) と  $2 \text{ g/m}^2$  を超える (HD-IFO 群,  $n = 63$ ) 2 つの群に分け背景因子や支持療法を比較した。HD-IFO 群は SD-IFO 群よりメスナ投与量と輸液の流量が有意に多く、メスナ投与量はそれぞれ  $91.0 \pm 25.6$  と  $84.1 \pm 23.9$  (% of daily ifosfamide dose)、輸液の流量はそれぞれ  $124.6 \pm 17.4$  と  $113.6 \pm 18.9$  ( $\text{mL/m}^2/\text{h}$ ) であった (Table 2-4)。イホスファミド 1 日投与量が  $2 \text{ g/m}^2$  を超える場合には、メスナ増量と輸液を少なくとも  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  で投与する必要性が示唆された。

Table 2-4 Summary of incidence of hemorrhagic cystitis by ifosfamide

	Chemotherapy cycles		<i>P</i> value
	SD-IFO <sup>a</sup> ( $n = 362$ )	HD-IFO <sup>b</sup> ( $n = 63$ )	
Incidence of HC - $n$ (%)			
All grades	7 (1.9%)	5 (7.9%)	0.021
Age			
Mean $\pm$ SD (years)	15.4 $\pm$ 6.2	10.6 $\pm$ 4.3	< 0.001
Sex - $n$ (%)			
Male	201 (55.5%)	28 (44.4%)	0.103
Female	161 (44.5%)	35 (55.5%)	
eGFR			
Mean $\pm$ SD ( $\text{mL/min/1.73 m}^2$ )	142.4 $\pm$ 38.3	145.4 $\pm$ 32.8	0.555
Mesna dose			
Mean $\pm$ SD (% of daily IFO dose)	84.1 $\pm$ 23.9	91.0 $\pm$ 25.6	0.039
Flow rate			
Mean $\pm$ SD ( $\text{mL/m}^2/\text{h}$ )	113.6 $\pm$ 18.9	124.6 $\pm$ 17.4	< 0.001

<sup>a</sup>Dose of ifosfamide is less than  $2.0 \text{ g/m}^2/\text{day}$ ; <sup>b</sup>Dose of ifosfamide is excess  $2.0 \text{ g/m}^2/\text{day}$   
eGFR, estimated glomerular filtration rate; HC, Hemorrhagic cystitis; IFO, ifosfamid

## 第2節 イホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子の評価と予防法への応用

### (1) イホスファミドによる出血性膀胱炎の発現時期と期間

イホスファミドによる出血性膀胱炎が発現した9例について、その発現時期と期間を調査した。発現時期の中央値は5日目（範囲: 2-6日目）、発現期間の中央値は3日間（範囲: 1-20日間）であった。出血性膀胱炎が原因で治療中止やイホスファミド投与量を減量することはなく、グレード3-4の重篤な出血性膀胱炎が発現した場合でも治療継続可能であった。

出血性膀胱炎が発現した場合、本研究では排尿を促すことから尿道カテーテルの留置まで重症度に応じた対処療法が行われていた。これまでの報告では、ホルマリン、硝酸銀、硫酸アルミニウムカリウム、プロスタグランジンなどの膀胱内注入が行われている<sup>36-39)</sup>。しかし、いずれの方法もイホスファミドによる出血性膀胱炎の治療としては十分な根拠はなく、一番の治療法は予防することと考えられている<sup>40)</sup>。

### (2) 出血性膀胱炎の予防法

イホスファミドによる出血性膀胱炎は、アクロレインが腎臓から尿中に排泄され、直接的に尿路上皮細胞を障害することによって発症すると考えられている。イホスファミドの消失半減期は、投与量が1.6-2.4 g/m<sup>2</sup>では約7時間、3.8-5.0 g/m<sup>2</sup>では約15時間に延長する<sup>41)</sup>。そのためイホスファミドを高用量投与する場合には、消失半減期の延長に伴いアクロレインなどの代謝物が尿路上皮細胞と接触する時間が延長し、出血性膀胱炎の発現頻度を高めると考えられる。アクロレインの中和剤であるメスナの消失半減期は108分<sup>42)</sup>と比較的短いため、メスナはイホスファミドの1日投与量の20%相当量をイホスファミド投与時、その4、8時間後の3回投与することになっている。したがって、高用量のイホスファミドを投与する場合には、メスナの増量や投与時間延長が有効な方法であることを支持するものである。しかし、これらの報告は成人を対象としているため、小児での体内動態を調査することが課題となる。ただし、

第 1 節の結果から小児と若年成人の患者間で出血性膀胱炎の発現頻度に差はなく、臨床的な違いは見出されていないため、小児でも成人と同様の支持療法が有効であることが示唆される。

イホスファミドによる出血性膀胱炎が発現した 9 例について、出血性膀胱炎が発現した次コースの支持療法を検証した (Table 2-5)。9 例中 7 例でメスナの増量や持続投与に変更することによって出血性膀胱炎の予防が可能であった。実臨床では、患者個々の体内動態を把握した上で投与設計することは困難であるため、出血性膀胱炎発現の危険性が高い場合には、メスナの増量と持続投与が有効な選択肢の一つになり得る。また、出血性膀胱炎がみられた場合、次コースの輸液流量は、同量もしくは増量しているが、増量したすべての症例で出血性膀胱炎の発現はみられなかった。

Table 2-5 Characteristics of nine patients with hemorrhagic cystitis

No.	Age (years)	Sex	Diag nosis	IFO-containing regimen				Mesna administration		Flow rate (mL/h/m <sup>2</sup> )	HC		
				Regi men	Cycle No. <sup>a</sup>	Daily IFO dose g/m <sup>2</sup> (g/body)		% <sup>b</sup>	Route		Grade	Dura tion (days)	Treat ment
1	8	M	RMS	VIE	12/12	1.8	(1.50)	60	iv	136	4	3	D
2	9	F	OS	IFO	5/6	3.0	(2.50)	100	civ	131	1	3-5	A
3	12	F	OS	IE	6/6	3.0	(2.50)	100	civ	131	0	3-5	A
					1/3	1.8	(2.20)	109	civ	115	3		
					2/3	1.8	(2.20)	109	iv	131	0		
					1/4	1.2	(1.55)	116	iv	98	2		
					2/4	1.2	(1.55)	206	civ	98	0		
4	13	M	EWS	VIDE	1/5	3.1	(4.20)	86	iv	135	3	2-6	B, C
5	13	M	SS	AI	2/5	3.1	(4.20)	95	civ	135	0	6	B
					1/5	2.0	(2.60)	69	iv	108	2		
					2/5	2.0	(2.60)	123	civ	131	0		
6	14	M	OS	IFO	2/2	2.6	(3.50)	129	civ	110	2	6-8	B
					1/1	2.9	(5.00)	60	iv	126	4	2-7	B, C, D
					1/6	2.0	(3.00)	80	iv	92	1	6-7	B
7	15	F	ES	AI	2/6	2.0	(3.00)	120	iv	99	0	6	B
					3/6	2.0	(3.00)	80	iv	118	2		
					4/6	2.0	(3.00)	120	iv	118	2		
					5/6	2.0	(3.00)	120	iv	118	0		
					1/4	3.0	(4.50)	53	iv	128	4	5-12	B, D
8	17	M	OS	IFO	2/4	3.0	(4.50)	120	civ	128	0	5-24	B
					1/1	1.8	(2.70)	89	iv	120	1		
					1/5	2.0	(3.40)	71	iv	94	4		
					2/5	2.0	(3.40)	71	iv	94	0		
9	27	M	PS	AI	1/5	2.0	(3.40)	71	iv	94	4	3	D
					2/5	2.0	(3.40)	71	iv	94	0		



<sup>a</sup>cycle number/total cycle number; <sup>b</sup>% of daily ifosfamide dose

A, encouragement of urination; B, large volumes of intravenous fluid and diuresis; C, continuous 24-hr mesna infusion; D, urinary catheterization.

AI, doxorubicin + ifosfamide; ES, epithelioid sarcoma; EWS, Ewing sarcoma; HC, hemorrhagic cystitis; IE, ifosfamide + etoposide; IFO, ifosfamide; OS, osteosarcoma; PS, prostatic sarcoma; RMS, rhabdomyosarcoma; SS, synovial sarcoma; TI, topotecan + ifosfamide; VIE, vincristine + ifosfamide + etoposide; VIDE, vincristine + ifosfamide + doxorubicin + etoposide

### 第 3 節 小括

イホスファミドを含む化学療法を受けた 30 歳未満の固形がん患者を対象に出血性膀胱炎の発現の有無によって分類し、その危険因子について検討した。以下に主な知見を要約する。

- 1) 小児および若年成人においてイホスファミドによる出血性膀胱炎の出現は、イホスファミド 1 日投与量と関連することが示唆された。
- 2) イホスファミドによる出血性膀胱炎の支持療法として、輸液流量を増やすこととメスナの増量や持続投与が出血性膀胱炎の発現率減少に寄与することが示唆された。
- 3) 夜間の輸液流量を減らすことによって出血性膀胱炎の発現頻度に影響はみられなかったため、小児がん患者の QOL を改善する有効な方法になる可能性がある。出血性膀胱炎発現の危険性が低い場合、その支持療法の有効性について臨床試験によって検証する必要がある。

以上より、イホスファミドの 1 日投与量が出血性膀胱炎の危険因子になる可能性があり、危険度に応じて大量輸液による強制利尿とメスナ投与方法を変更することが重要であることが示唆された。今後、イホスファミドとその代謝物の体内動態を検討する上で、重要な情報となる。第 3 章では、イホスファミドと同じナイトロジェンマスタード系の抗悪性腫瘍剤であるシクロホスファミドによる出血性膀胱炎の効果的な予防法の提案を試みる。

### 第3章 シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現及び効果的な予防法の提案

シクロホスファミドは、イホスファミドと同様に小児固形がんの治療に必要不可欠な抗がん薬の一つになっている<sup>17, 18, 22, 43, 44)</sup>。シクロホスファミドはプロドラッグであるため、肝代謝酵素 CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、および CYP3A4 によって代謝され、活性化された代謝物が抗腫瘍効果を発揮する<sup>45-47)</sup>。シクロホスファミドの代謝経路を Fig. 3-1 に示す。イホスファミドと同様に、最終代謝産物の一つとして強い尿路障害性を有するアクロレインが生成する<sup>48)</sup>。

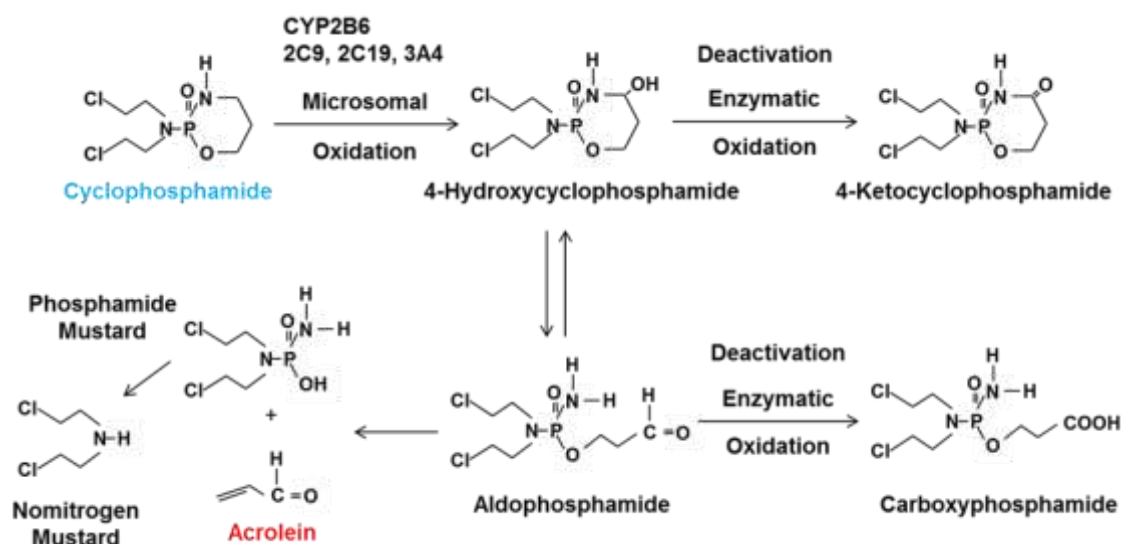


Fig. 3-1 Metabolism of cyclophosphamide

シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の支持療法は、造血幹細胞移植時の前治療として高用量投与する場合、メスナ投与と大量輸液 (3 L/m<sup>2</sup>/day) による強制利尿を行うことが推奨されている<sup>28)</sup>。シクロホスファミドによる出血性膀胱炎は、イホスファミドと比較すると発現頻度は低く、発現頻度の違いはイホスファミドの代謝産物の一つであるクロロアセトアルデヒドが尿路障害性を有するためと考えられている<sup>48)</sup>。通常の化学療法におけるメスナ使用は推奨されていないが、小児がん患者を対象とする場合、造血幹細胞移植時の前治療に相当するシクロホスファミド投与量を使用することがある<sup>49)</sup>。米国の Children's Oncology Group ガイド

ラインでは、シクロホスファミド投与量が  $1,200 \text{ mg/m}^2$  を超える場合には大量輸液による強制利尿とともにメスナを使用することになっている<sup>50)</sup>。しかし、小児がん患者を対象とした場合、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子や最適な支持療法は確立されていない。

出血性膀胱炎は、一般的に年齢、血小板減少、造血幹細胞移植、骨盤部への放射線照射、BK ウィルスへの感染などが危険因子と考えられている<sup>28-31)</sup>。しかし、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の特異的な危険因子や予防法、さらに造血幹細胞移植時の前治療以外で使用する場合の情報は限られている<sup>51, 52)</sup>。

本章では、シクロホスファミドを投与された小児固形がん患者を対象にレトロスペクティブに出血性膀胱炎の危険因子や最適な支持療法について検討した。

## 第 1 節 小児または若年成人に対するメスナ及び大量輸液による出血性膀胱炎予防

### (1) 対象と方法

2010 年 1 月から 2014 年 12 月までに国立がん研究センター中央病院小児腫瘍科において、シクロホスファミドを含む化学療法が開始された 30 歳未満の固形がん患者 81 名を対象とした。(Table 3-1)。造血器腫瘍患者は病態として易出血状態になることもあるため除外した。患者背景 (がん種、性別、年齢)、イホスファミド投与量、メスナ投与量、輸液の流量、血清クレアチニン値、骨盤への放射線照射の有無、出血性膀胱炎の発現や発現期間など解析に必要な情報を電子カルテから収集した。BK ウィルス感染は出血性膀胱炎の危険因子となるが、実臨床で測定を行っていないため調査項目に含めなかった。各調査項目は、化学療法開始前の情報で直近のものとし、サイクル毎に評価した。シクロホスファミド投与量 ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) は、各サイクル開始時の体表面積と実際の投与量から再計算し、体表面積の算出には Mosteller 式を用いた<sup>34)</sup>。出血性膀胱炎は、Droller らの重症度分類の基準 (Table 2-2) に従い判定した<sup>35)</sup>。

Table 3-1 Patient characteristics

	Number of patients (n = 81)		Total chemotherapy cycles (n = 486)	
	No.	%	No.	%
Sex				
Male	48	59.2	253	52.1
Female	33	40.7	233	47.9
Age <sup>†</sup> (yr)				
Median			12	
Range			0–29	
Diagnosis				
Rhabdomyosarcoma	24	29.6		
Retinoblastoma	19	23.5		
Ewing's sarcoma	18	22.2		
Neuroblastoma	9	11.1		
Others	11	13.6		
CPA-containing chemotherapy				
VAC			195	40.1
iVAC			22	4.5
VDC			15	3.1
VDC-IE <sup>‡</sup>			114	23.5
VDC-CE <sup>‡</sup>			46	9.5
TC			53	10.9
Others			41	8.4
Incidence of HC				
Grade 2–4	1	1.2	1	0.2
All grades	4	4.9	5	1.0

<sup>†</sup>Age at first chemotherapy cycle; <sup>‡</sup>Number of VDC chemotherapy cycles

CPA, cyclophosphamide; HC, hemorrhagic cystitis; IE, ifosfamide + etoposide; TC, topotecan + cyclophosphamide; VAC/iVAC, vincristine + actinomycin D + cyclophosphamide; VDC-CE, vincristine + doxorubicin + cyclophosphamide alternating with carboplatin + etoposide; VDC-IE, vincristine + doxorubicin + cyclophosphamide alternating with ifosfamide + etoposide

調査期間内にシクロホスファミドを含む 14 の化学療法レジメンが用いられ、合計 486 サイクルが施行された。出血性膀胱炎は、81 例中 4 例 (4.9%)、486 サイクル中 5 サイクル (1.0%) で発現がみられ、発現頻度はこれまでの報告よりも低い<sup>28, 30, 31, 51)</sup>。出血性膀胱炎の危険因子について検討するため、対象患者を出血性膀胱炎の発現群と非発現群に分類し、両群において調査項目を比較した。次に、シクロホスファミドの投与方法によって分割投与するレジメンと単回投与するレジメンに分類し、単回投与レジメンについては、シクロホスファミド投与量によって低・中等量群 ( $<1,500 \text{ mg/m}^2$ ) と高用量群 ( $\geq 1,500 \text{ mg/m}^2$ ) に層別化し、メスナ投与の有無と輸液流量を比較検討した。さらに、出血性膀胱炎発現時の支持療法を調査し、メスナ投与と大量輸液の有効性を評価した。統計学的有意差検定は、群間比較には Fisher's exact test、平均値の比較には Student's *t*-test もしくは Welch's *t*-test を用い、*P* 値が 0.05 未満のとき、統計的有意差があるものとした。

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い、当院研究倫理審査委員会の承認を得て行った (研究課題番号: 2014-333)。

## (2) 出血性膀胱炎に対する支持療法

シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の予防法として、メスナと大量輸液による強制利尿を行った。メスナは、シクロホスファミド 1 日投与量の 20-40% 相当量をシクロホスファミド投与時、その 4、8 時間後に投与し、輸液は  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  の流速で投与した。ただし、夜間の排尿回数が増えると不眠などによる QOL 低下や小児の場合は夜尿の原因ともなるため、シクロホスファミド 1 日投与量が  $1,500 \text{ mg/m}^2$  未満の場合、3 回目のメスナ投与時に尿潜血や膀胱刺激様症状が見られなければ医師の判断で輸液の流速を減らすか輸液を終了した。

### (3) シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現の危険因子の評価

シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現の危険因子を評価するため、化学療法 486 サイクルを出血性膀胱炎の発現群 (n = 5) と非発現群 (n = 481) に分類して背景因子を比較した (Table 3-2)。年齢、性別、シクロホスファミド 1 日投与量、メスナ投与量、輸液の流量、血小板減少 (グレード 3 または 4) を比較したところ両群に有意な差はみられなかった。シクロホスファミド 1 日投与量は、出血性膀胱炎の発現群では  $1,020 \pm 550 \text{ mg/m}^2$ 、非発現群では  $1,330 \pm 310 \text{ mg/m}^2$  になり、非発現群でシクロホスファミド投与量が有意に高値を示した ( $P = 0.029$ )。しかし、本結果を支持する報告はなく、症例数が限られることから、さらなる検討が必要である。

Table 3-2 Investigation of factors contributing to cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis

	No HC (n = 481)	HC (n = 5)	P value
Age			
Mean $\pm$ SD (years)	13.6 $\pm$ 7.4	16.6 $\pm$ 2.9	0.368
Sex			
Male	251 (52%)	2 (40%)	0.674
Female	230 (48%)	3 (60%)	
CPA dose/cycle			
Mean $\pm$ SD ( $\text{mg/m}^2$ )	1,330 $\pm$ 310	1,020 $\pm$ 550	0.029
Mesna dose			
Use - n (%)	292 (61%)	4 (80%)	0.093
Mean $\pm$ SD (% of daily CPA dose)	118.0 $\pm$ 31.3	144.5 $\pm$ 26.7	
Flow rate			
Mean $\pm$ SD ( $\text{mL/h/m}^2$ )	119.6 $\pm$ 29.8	123.0 $\pm$ 37.0	0.804
Thrombocytopenia			
G3 and G4 - n (%)	20 (4%)	0 (0%)	1.000

CPA, cyclophosphamide; HC, hemorrhagic cystitis.



#### (4) シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の臨床的特徴

シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現の臨床的特徴を考察するため、出血性膀胱炎の発現がみられた4症例(5サイクル)について、発現時期や期間を調査した(Table 3-3)。出血性膀胱炎の発現時期は、シクロホスファミド投与開始2日後(範囲: 1-2日)、発現期間の中央値は1日(範囲: 1-4日間)であった。次に、実施した支持療法の有効性を検証するため、メスナ投与量、輸液の流量、アプレピタント併用の有無について、出血性膀胱炎が出現した次のサイクルとの違いについて調査した。

グレード3の出血性膀胱炎が発現した場合でも、輸液の流量とメスナ投与量を増やすことで次のサイクルでは出血性膀胱炎が予防可能であった。3回目のメスナ投与後、尿潜血や膀胱刺激様症状がみられない場合には輸液の流量を減らしているが、輸液の流量を142から67 mL/m<sup>2</sup>/hへ減らした時、グレード1の出血性膀胱炎がみられた(症例No. 1)。しかし、次のサイクルでは輸液流量を減らさずに継続したところ出血性膀胱炎はみられなかった。出血性膀胱炎が発現したすべての症例において、出血性膀胱炎が原因で治療中止やシクロホスファミド投与量の減量を行った症例はみられなかった。

Table 3-3 Characteristics of the four patients with hemorrhagic cystitis

No.	Age years	Sex	Diag nosis	CPA-containing regimen			Mesna dose % <sup>‡</sup>	Flow rate <sup>§</sup> mL/m <sup>2</sup> /h		Aprepi tant	HC	
				Regimen	Cycle No. <sup>†</sup>	Daily CPA dose mg/m <sup>2</sup> (mg/body)					Grade	Duration (time to onset)
1	13	M	RMS	VAC	11/12	1125 (1500)	160	142 → 67	-	-	1	2 (1-2)
					12/12	1125 (1500)	160	150 → 150	+	+	0	
2	16	F	RMS	VAC	5/14	1528 (2150)	112	107 → 107	+	+	1	1 (2)
					6/14	1528 (2150)	112	107 → 107	-	-	0	
					10/14	1018 (1400)	171	109 → 109	-	-	3	1 (2)
					11/14	1018 (1400)	271	109 → 109	-	-	0	
3	17	F	EWS	VDC-IE	1/7	1195 (1780)	135	81 → 81	-	-	1	1 (2)
					2/7	1195 (1780)	135	100 → 100	-	-	0	
4	21	M	OS	TC	1/1	247 (350)	0	-	-	-	1	4 (1-4)

<sup>†</sup>Cycle number/total cycle number; <sup>‡</sup>Percentage of daily cyclophosphamide dose; <sup>§</sup>Initial flow rate → flow rate after third mesna dose.

CPA, cyclophosphamide; EWS, Ewing's sarcoma; HC, hemorrhagic cystitis; OS, osteosarcoma; RMS, rhabdomyosarcoma; TC, topotecan + cyclophosphamide; VAC, vincristine + actinomycin D + cyclophosphamide; VDC-IE, vincristine + doxorubicin + cyclophosphamide alternating with ifosfamide + etoposide.

シクロホスファミドはプロドラッグであるため、主に CYP2B6 によって代謝され、活性化される。CYP2B6 には複数の遺伝子多型が存在し、シクロホスファミドの PK (pharmacokinetics) / PD (pharmacodynamics) は、その遺伝子多型の影響を受けることが報告されている<sup>53, 54)</sup>。さらに、CYP2B6\*2 と出血性膀胱炎の発現には関連性があることが示されている<sup>55)</sup>。しかし、実臨床で CYP2B6 の遺伝子多型を測定することはないため、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現への影響について小児を対象とした臨床試験によって検証する必要がある。

シクロホスファミドの代謝には、一部 CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 が関与するため、CYP3A4 や CYP2C9 の活性に影響を与えるアプレピタント [イメンド®カプセルインタビューフォーム、2017 年 8 月 改訂 (第 9 版)] を制吐剤として使用した場合、毒性の発現に影響を与える可能性が考えられる。そのため、シクロホスファミドとの相互作用によって出血性膀胱炎発現への影響を調査したが、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎発現との関連性は見出せなかった。

## 第2節 シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の予防法の検討

### (1) メスナ投与と大量輸液による予防

シクロホスファミドの半減期は、投与量が 6-80 mg/kg の範囲では 2-9 時間<sup>56)</sup>になるが、個体差が大きいため投与量毎の半減期を一概に比較することはできない。アクロレインの中和剤であるメスナの消失半減期は 108 分<sup>42)</sup>と短く、高用量のイホスファミド投与を行う場合には、メスナの持続投与が出血性膀胱炎の有効な予防法の一つになる。しかし、シクロホスファミドでは、イホスファミドと比較して半減期が短く、メスナ持続投与よりも大量輸液による強制利尿によって物理的にアクロレインと尿路上皮細胞の接触時間を短縮することが有効であると考えられる。実際、造血幹細胞移植時の前処置でシクロホスファミドを投与する場合、メスナ投与の有無が出血性膀胱炎発現率に及ぼす影響を比較した試験では、両者に有意な差は見られなかった<sup>57, 58)</sup>。

造血幹細胞移植時の前処置としてシクロホスファミドを使用する場合、メスナの投与法はシクロホスファミド 1 日投与量の 40% 相当量をシクロホスファミド投与時、その 4、8 時間後に投与することになっている。したがって、通常の化学療法でメスナを投与する場合、その投与量と同等もしくはより少ない投与量で効果が期待できる。そこで、実臨床でのメスナ投与量を調査したところ、シクロホスファミド 1 日投与量の 0-270% 相当量で使用されていた (Fig. 3-2)。出血性膀胱炎を発現した 4 例では、メスナ 1 日投与量は 120% を超えているため、メスナの増量だけでは出血性膀胱炎の発現予防に寄与しない可能性がある。

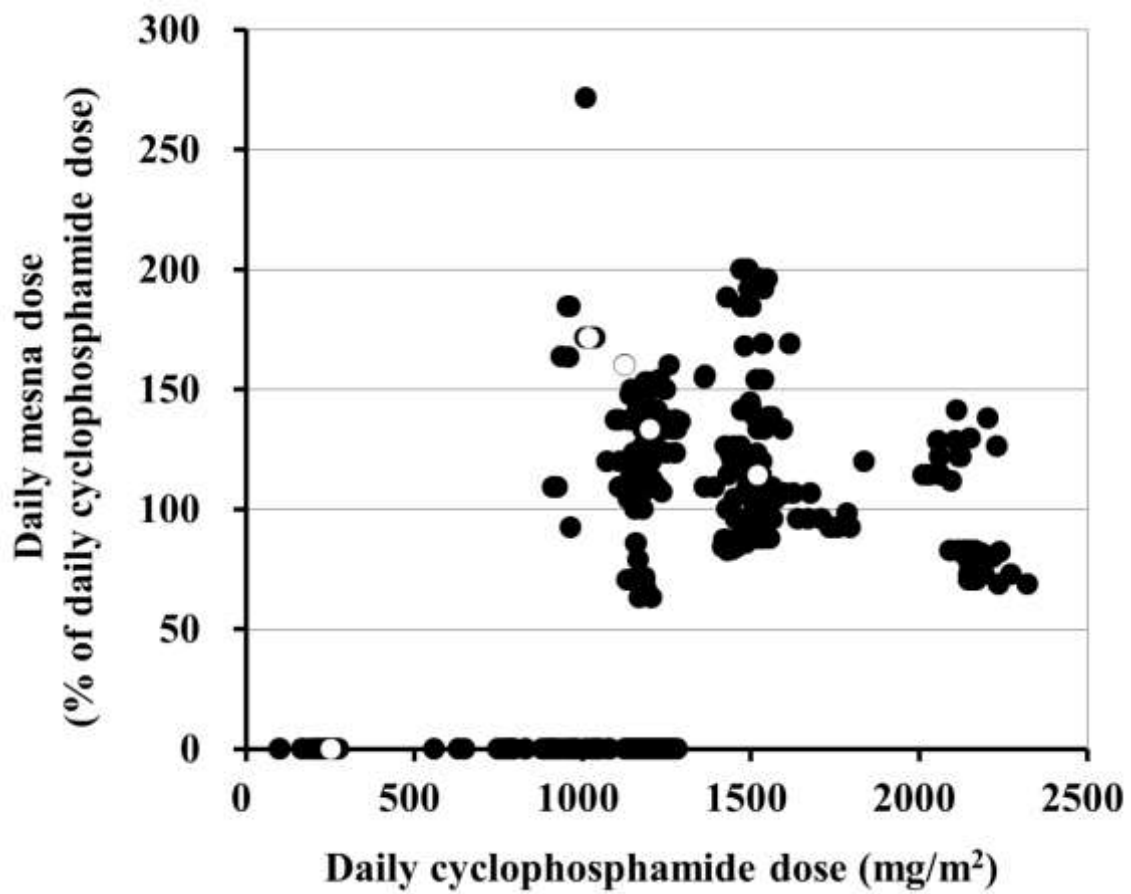


Fig. 3-2 Effect of mesna dose and continuous hydration on prophylaxis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis

Patients were categorized according to the presence (open circle) or absence (filled circle) of hemorrhagic cystitis.

造血幹細胞移植時の前処置以外でシクロホスファミドを投与する場合、輸液による強制利尿は出血性膀胱炎の有効な予防法の一つになるが、メスナ使用を推奨するガイドラインはない。しかし、小児固形がんを対象とした場合、シクロホスファミド投与量は低用量から造血幹細胞移植時の前処置に相当する高用量まで幅広く、実臨床ではシクロホスファミドによる出血性膀胱炎予防にメスナが用いられている。そのため、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎予防策としてメスナ投与と輸液による強制利尿の有効性を検証することは重要である。

本研究の対象である化学療法 486 サイクルには、シクロホスファミドの投与方法や投与量だけでなく、メスナの投与方法が異なる症例が含まれる。そこで、シクロホスファミド投与方法によって分割投与群 (n = 56) と単独投与群 (n = 430) に分類し、さらに単独投与群についてはシクロホスファミド投与量  $1,500 \text{ mg/m}^2$  未満の低・中等量群 (n = 311) と  $1,500 \text{ mg/m}^2$  以上の高用量群 (n = 119) に分類し、出血性膀胱炎の発現と輸液流量を比較した (Table 3-4)。分割投与群では、シクロホスファミド 1 日投与量範囲は  $99\text{-}275 \text{ mg/m}^2$ 、メスナ投与と輸液による強制利尿は行われていなかった。出血性膀胱炎は 56 サイクル中 1 サイクル (1.8%) で見られたことから、分割投与時にも発現する危険性は排除できない。しかし、すべての患者に対して同様の支持療法を行うことは過剰な治療になるため、出血性膀胱炎の発現歴がある場合など危険度を評価した上で行う必要がある。

## (2) 出血性膀胱炎の予防法

造血幹細胞移植時の前処置で使用するシクロホスファミド 50 mg/kg は、体重 30 kg を体表面積  $1 \text{ m}^2$  として換算<sup>59)</sup> すると  $1,500 \text{ mg/m}^2$  に相当するため、この値を基準とし投与量で層別化を行った。低・中等量群においてメスナ投与の有無で輸液流量を比較した結果、それぞれ  $106 \pm 16 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  と  $126 \pm 25 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  になり、メスナ投与群で輸液流量が有意に少なかった ( $P < 0.01$ )。さらに、低・中等量群 311 サイクル中 3 サイクル (1.0%) で出血性膀胱炎が発現し、そのすべてでメスナが投与されていた。本来なら輸液流量は  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  に保つことになっているため、メスナ投与にかかわらず、輸液は  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  で投与する必要性が示唆された。高用量群では、199 サイクルのすべてでメスナを投与し、輸液流量は  $115 \pm 16 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  であった。造血幹細胞移植時の前処置に準じて、メスナ投与と輸液による強制利尿が全サイクルで行っていた。199 サイクル中 1 サイクル (0.8%) で出血性膀胱炎が発現し、原因として輸液流量 ( $107 \text{ mL/m}^2/\text{h}$ ) が不足していた可能性が考えられる (Table 3-4)。

Table 3-4 Relationship between daily dose of mesna and fluid volume

	Number of cycles	Daily CPA dose (mg/m <sup>2</sup> ) median (range)	Incidence of HC N (%)	with mesna	without mesna	Flow rate (mL/m <sup>2</sup> /h)	<i>P</i> value
Fractionated administration							
	(n = 56)	242 (99-275)	0 1 (1.8%)	0 (0%) 0	0 56 (100%)	-	
Single dose administration							
Low and intermediate	(n = 311)	1194 (559-1,499)	3 (1.0%) 0	177 (57%) 0	0 134 (43%)	106 ± 16 126 ± 25	< 0.01
High	(n = 119)	1554 (1,500-2,321)	1 (0.8%) 0	119 (100%) 0	0 0 (0%)	115 ± 16 -	

CPA, cyclophosphamide; HC, hemorrhagic cystitis



### 第3節 小括

シクロホスファミドを含む化学療法を受けた 30 歳未満の固形がん患者を対象に出血性膀胱炎の発現の有無によって分類し、その危険因子について検討した。以下に主な知見を要約する。

- 1) 通常の化学療法では、小児および若年成人におけるシクロホスファミドによる出血性膀胱炎の出現頻度は少なく、輸液による強制利尿とメスナ投与によって予防できる可能性がある。
- 2) シクロホスファミドによる出血性膀胱炎に対する支持療法は、シクロホスファミドの投与方法や投与量による使い分けを考慮する必要がある。
- 3) 小児固形がんに対してシクロホスファミドを  $1,500 \text{ mg/m}^2$  以上投与する場合には、出血性膀胱炎に対する支持療法は造血幹細胞移植時の前処置に準じ、 $1,500 \text{ mg/m}^2$  未満の場合にはメスナ投与にかかわらず輸液  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  を投与することが目安となる可能性がある。

以上より、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子を同定することはできなかったが、シクロホスファミド投与量に応じて大量輸液による強制利尿とメスナ投与方法を変更することが重要であることが示唆された。今後は、さらに症例を集積するとともにシクロホスファミドとその代謝物の体内動態を検討する上で重要な情報となる。第 4 章では、イリノテカンによる下痢の新規発現機序を推定し、小児がん患者の QOL 向上を図るため、新規発現機序に基づく予防法の提案を試みる。

## 第4章 イリノテカン誘発性消化管毒性に対する新規毒性回避方法の提案

イリノテカン (CPT-11) は小児悪性固形腫瘍を含む複数の癌腫に対して効能・効果を有している。小児悪性固形腫瘍は対象症例が少ない稀な疾患であるため、大規模臨床試験の実施は困難であるが、海外や国内における第 I / II 相試験や症例報告が多数報告されている。CPT-11 単剤では、再発/治療抵抗性の小児悪性固形腫瘍、再発骨軟部腫瘍、及び横紋筋肉腫に対する有効性が報告されている<sup>60-66)</sup>。横紋筋肉腫、神経芽腫、及びユーイング肉腫に対してビンクリスチンやテモゾロミドとの併用療法の有効性が再発/治療抵抗例で報告されている<sup>67-70)</sup>。本邦での小児悪性固形腫瘍に対する CPT-11 投与方法は、1 日 1 回 20 mg/m<sup>2</sup>を 5 日間連日点滴静注し、これを 1 週間毎に 2 回繰り返し、少なくとも 1 週間休薬する。これを 1 クールとして、投与を繰り返す。一方、成人固形癌の投与方法は、癌種によって異なるが、1 日 1 回 100-180 mg/m<sup>2</sup>を点滴静注するため、投与方法が大きく異なる。CPT-11 の用量規制毒性として、発熱性好中球減少症や下痢が報告されている。CPT-11 は、難治性小児悪性固形腫瘍に対する有望な医薬品の一つであり、薬剤師は適切な支持療法を提案することによって治療継続を支援していく必要がある。

CPT-11 は静脈内に投与後、肝臓及び各組織においてカルボキシエステラーゼによって活性代謝物 SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) に変換される。SN-38 は、CPT-11 の約 1,000 倍のトポイソメラーゼ I 阻害活性を有し<sup>71)</sup>、主に肝臓の代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT: UDP-glucuronosyltransferase) の分子種の一つである UGT1A1 によってグルクロン酸抱合され、SN-38 のグルクロン酸抱合体 (SN-38G) となる<sup>71)</sup>。SN-38G は、主に ABC (ATP-binding Cassette) トランスポーターである p-glycoprotein (P-gp)、multidrug resistance associated protein 2 (MRP2)、または breast cancer resistance protein (BCRP) によって胆汁中に排泄されるため<sup>71)</sup>、SN-38G の腎クリアランスは、全 SN-38 クリアランスの 30%に過ぎない<sup>72)</sup>。腸管内に排泄された SN-38G は、腸内細菌叢が産生する  $\beta$ -グルクロニダーゼに

より SN-38 に脱抱合され、小腸上皮細胞を傷害し下痢を誘発する。

CPT-11 による下痢には、早発性と遅発性下痢症がある。コリン作動性の早発性下痢症は、抗コリン薬により緩和するが、遅発性下痢症は改善されない。したがって、遅発性下痢症は CPT-11 の用量規制毒性の一つになっている。明確な発現機序は未だ不明だが、腸内細菌叢により脱抱合された SN-38 が原因であると指摘されている<sup>73)</sup>。実臨床では、 $\beta$ -グルクロニダーゼ阻害活性を有する半夏瀉心湯などの漢方薬が下痢予防に効果がある<sup>74)</sup>。ラットにおいて、ペニシリンやストレプトマイシン投与による腸内殺菌により  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を抑制した場合、CPT-11 による下痢が改善することから、その予防効果が報告されている<sup>75)</sup>。実際、セフィキシム (CFIX: cefixime) 又はセフポドキシムを経口投与することによって、CPT-11 の最大耐性量を増加させることが報告されている<sup>76, 77)</sup>。抗生剤投与による腸内殺菌は、小児固形腫瘍に対する CPT-11 投与方法に特徴的な予防法だが、耐性菌の増加を考慮すれば、抗生物質の使用には制限があるため、抗生物質を使わない有効な支持療法の開発が望まれる。

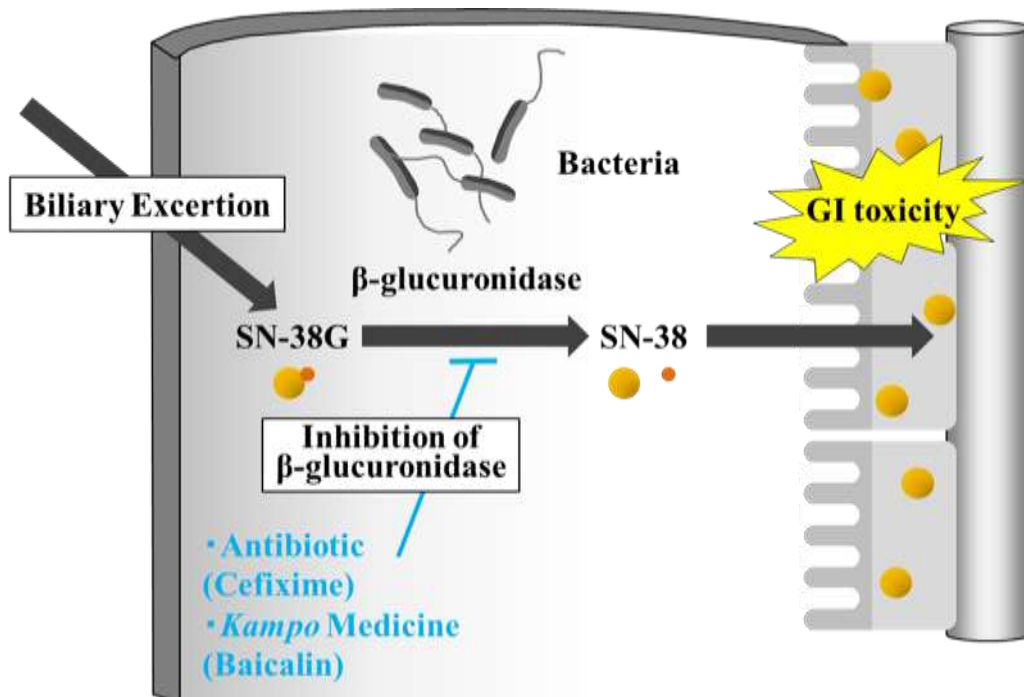
OATP1B1 及び OATP1B3 は広い基質認識性を有するため、多くの医薬品の肝取り込みに関与することが知られている<sup>78)</sup>。SN-38 は、医薬品の肝取り込みに重要な役割を果たす OATP1B1 の基質であり<sup>79)</sup>、OATP1B1 機能低下型遺伝子変異体を持つ患者では、SN-38 の全身への曝露量が増加し重篤な副作用発現が生じることが報告されている<sup>80)</sup>。

OATP2B1 は肝臓や小腸を含む複数の組織に発現する OATP ファミリーメンバーである<sup>81)</sup>。OATP2B1 は特に、小腸上皮細胞刷子縁膜に局在し、医薬品の pH 依存的な輸送を媒介し<sup>82-84)</sup>、消化管吸収に寄与する<sup>85)</sup>。OATP2B1 は、OATP1B1 と同様に<sup>86, 87)</sup>、複数の結合部位を有するため幅広い基質認識性を示し、様々な薬物を基質として輸送する<sup>77)</sup>。フェキソフェナジンは果汁と一緒に服用すると消化管吸収が減少するため、食物と医薬品との相互作用が注目されている<sup>88)</sup>。フェキソフェナジンは OATP2B1 の基質薬物であり、その消化管吸収に OATP2B1 が関与する。これまで、果汁の成分がフェキソフェナジンの吸収を抑制する臨床報

告が複数出てきている<sup>89-91)</sup>。SN-38 は OATP1B1 に輸送され、OATP1B1 と OATP2B1 は類似した輸送特性を持つことから<sup>79)</sup>、OATP2B1 が SN-38 の小腸上皮細胞の取り込みに関与することが考えられた。

CPT-11 による遅発性の下痢は、その活性代謝物 SN-38 による小腸上皮細胞傷害によって発生し、その機序は腸内細菌による脱抱合阻害のみで説明され (Fig. 4-1 A)、SN-38 の消化管組織内への移行過程は不明である。しかし、SN-38 の消化管組織への蓄積と細胞毒性の関連性を示唆する報告が存在する<sup>92, 93)</sup>。Caco-2 細胞を使用した検討では、SN-38 がトランスポーターを介して細胞内に蓄積し、それが半夏瀉心湯の主成分であるバイカリンによって阻害されることが報告されている<sup>94)</sup>。さらに、β-ラクタム系抗生物質は OATP の基質になるため<sup>81, 95)</sup>、CFIX の下痢予防効果は、OATP2B1 による SN-38 の吸収阻害が寄与している可能性が考えられる。本章では、CPT-11 に由来する下痢発症の機構として輸送体 OATP2B1 が関与するという仮説を検証し、新しい視点から CPT-11 による下痢発現予防策を提案することとした (Fig. 4-1 B)。また、果汁を下痢予防に利用できれば、併用薬の副作用を回避するだけでなく薬嫌いの患児にとって福音となる。

(A) Current mechanism to ameliorate GI toxicity in CPT-11 therapy



(B) Proposal of new mechanism to ameliorate GI toxicity in CPT-11 therapy

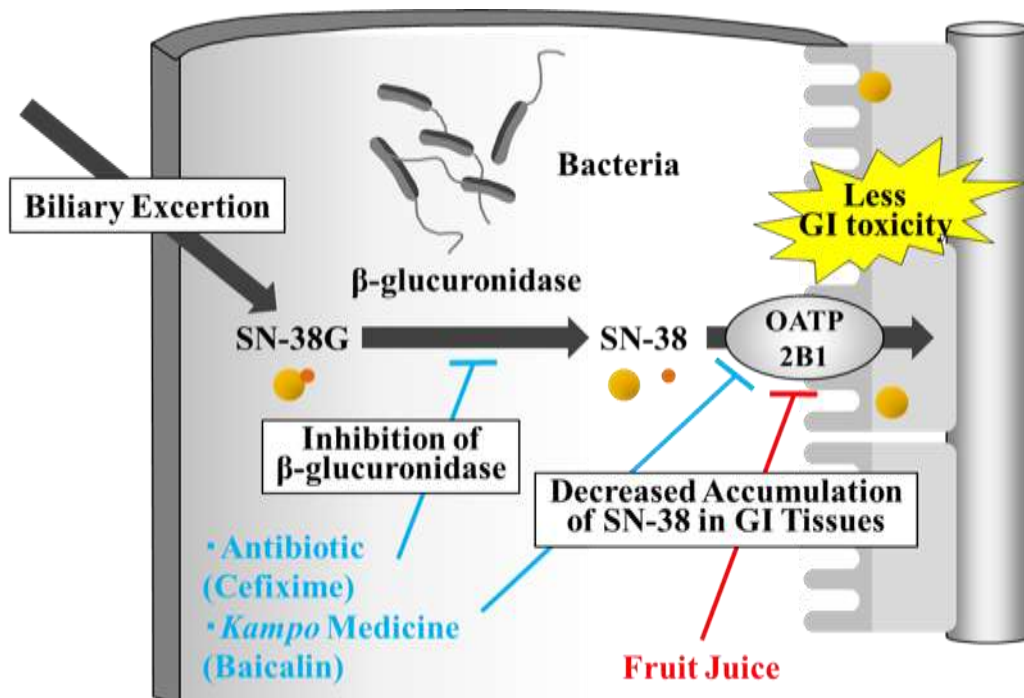


Fig. 4-1 Putative mechanism of irinotecan-induced late-onset diarrhea

GI, gastrointestinal

## 第 1 節 OATP2B1 を介した SN-38 の輸送特性の評価

### (1) SN-38 の OATP2B1 を介した輸送の評価

CPT-11 による遅発性下痢の発症を規定する因子として、OATP2B1 を介した SN-38 の消化管組織細胞内蓄積が重要であるという仮説のもと、SN-38 の消化管組織取り込みに寄与するトランスポーターの探索を行った。本検討では、SN-38 の肝取り込みに働くトランスポーター OATP1B1 と同じファミリーで消化管に発現する OATP2B1 に着目した。OATP2B1 の complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) をアフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、OATP2B1 を発現させた実験系を用いて SN-38 の取り込みを検討したところ、対照として水を注入した卵母細胞と比べ、OATP2B1 を発現した卵母細胞で SN-38 の取り込みは顕著に増大した (Fig. 4-2)。pH 6.5 での SN-38 の取り込みは時間依存的に増加し、対照 (水注入卵母細胞) よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。さらに、10 分間の取り込みを比較した時、OATP2B1 発現卵母細胞ならびに対照 (水注入卵母細胞) でそれぞれ  $1.15 \pm 0.13$  と  $0.624 \pm 0.066$   $\mu\text{L}/\text{oocyte}$  であった。以上より、OATP2B1 は、SN-38 の消化管から細胞内への取り込みに寄与することが示唆された。

これまでは、OATP2B1 による SN-38 の輸送を見出すことはできなかったが<sup>79, 96)</sup>、その理由として、アフリカツメガエル卵母細胞に OATP2B1 を発現させるため、pcDNA3 プラスミドベクターを用いていたことや実験系が異なることが考えられる。本検討では、pGEMHE プラスミドベクターを用いているが、pGEMHE ベクターを用いると、タンパク合成を促進し、アフリカツメガエルの卵母細胞に標的蛋白の発現量を高めるため有用であることが知られている<sup>97, 98)</sup>。

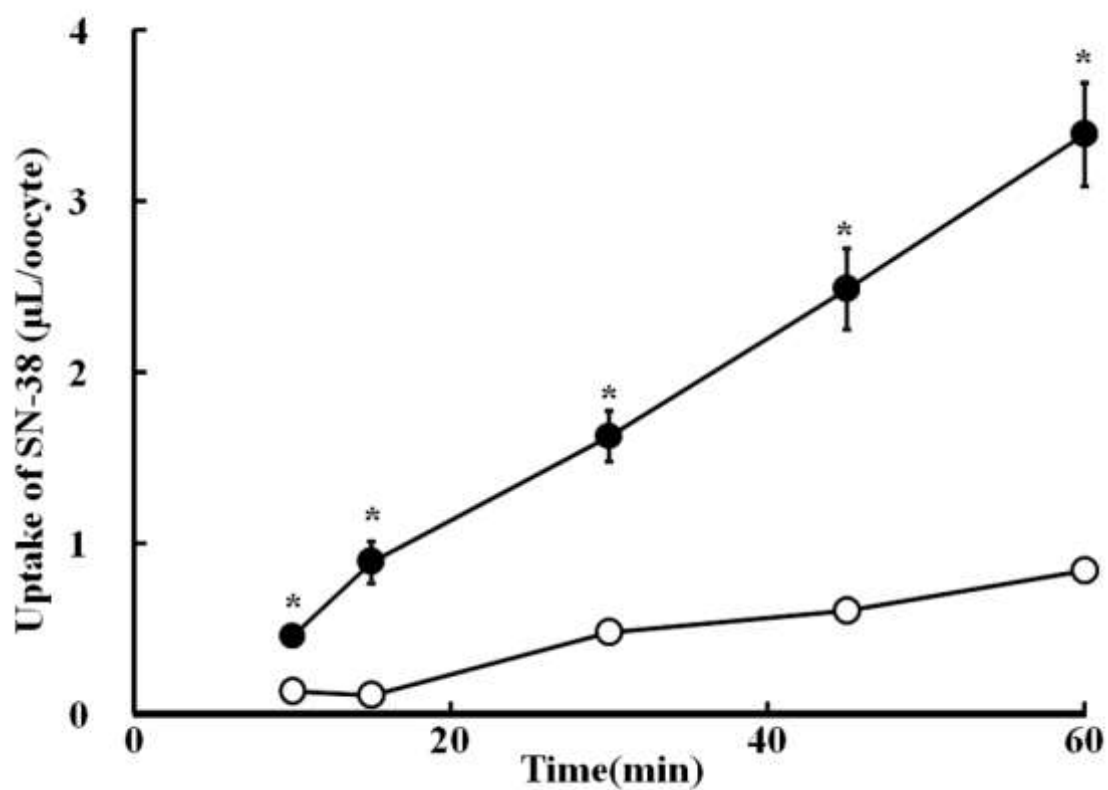


Fig. 4-2 Time courses of uptake of SN-38 by OATP2B1

Uptake of SN-38 (carboxylate form, 0.1  $\mu\text{M}$ ) by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1 (filled circle) or water-injected oocytes (open circles) over 60 min was measured at pH 6.5. Each result represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3-8$ ) and (\*) indicates a significant difference from the uptake by water-injected oocytes ( $P < 0.05$ ).

## (2) SN-38 の OATP2B1 を介した pH 依存的な輸送の評価

CPT-11 と SN-38 は、酸性条件ではラクトン体を形成し、生理的 pH やそれより高い条件ではカルボン酸体を形成する<sup>99)</sup> (Fig.4-3)。CPT-11 や SN-38 のラクトン体はカルボン酸体よりも単純拡散による膜透過性が高く<sup>92, 93)</sup>、ヒト大腸癌由来 HT-29 細胞を用いた検討では、SN-38 のラクトン体ではカルボン酸体より強いアポトーシス誘導作用がみられている<sup>93)</sup>。In vivo の検討では、腸管内をアルカリ化することによって SN-38 による下痢を軽減できる<sup>93)</sup>。実臨床では、CPT-11 による遅発性の下痢予防策として、ウルソデオキシコール酸による胆汁のアルカリ化と炭酸水素ナトリウムによる腸管内のアルカリ化によって SN-38 をカルボン酸体に変換することで吸収を抑制し、さらに、酸化マグネシウムによって SN-38 の排泄を促進する方法が報告されている<sup>100)</sup>。

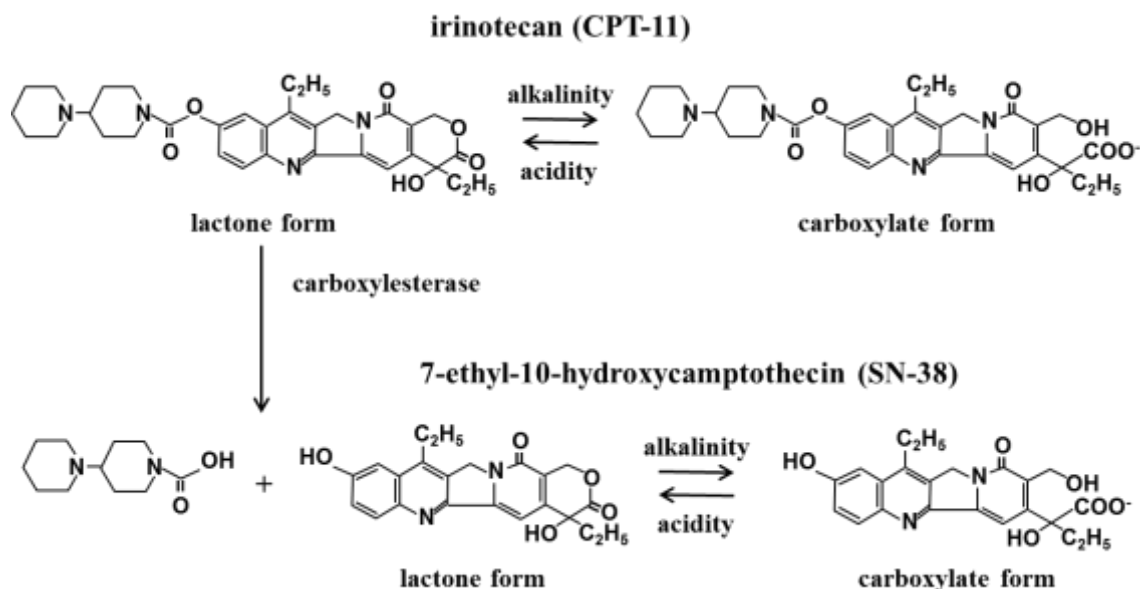


Fig. 4-3 Lactone and carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and SN-38



OATP2B1 は、複数の基質に対して生理的条件下よりも酸性の pH で高い活性を示すことが知られている<sup>82)</sup>。そこで、SN-38 を pH 3 か pH 9 のどちらかの条件で一晩プレインキュベーションし、それぞれ pH 6.5 もしくは pH 8 の条件で取り込みを検討した (Table 4-1)。平衡移動反応が最小限となるように 10 分間での取り込みで評価したところ、SN-38 のラクトン体の輸送活性が高く、pH 9 よりも pH 6.5 で高い取り込みが見られた。SN-38 の受動拡散による膜の透過性は pH 依存적であり、弱酸性の条件下でも透過量が増加した。SN-38 のラクトン体とカルボン酸体はどちらも OATP2B1 によって輸送され、小腸粘膜微小環境 pH では OATP2B1 を介した輸送が促進されることから、下痢発症には OATP2B1 を介する SN-38 の吸収機構の関与が考えられた。

Table 4-1 pH dependence on SN-38 uptake by OATP2B1 in *Xenopus* oocytes

Uptake ( $\mu\text{L}/10 \text{ min} \cdot \text{oocyte}$ )						
	Water-injected		OATP2B1-expressing		Difference	
	oocytes		oocytes		(OATP2B1-mediated)	
Preincubation pH	Uptake pH					
	6.5	8.0	6.5	8.0	6.5	8.0
3.0	0.605	0.459	0.931	0.590	0.327	0.140
	$\pm 0.04$	$\pm 0.07$	$\pm 0.08$	$\pm 0.06$	$\pm 0.080$	$\pm 0.065$
9.0	0.267	0.159	0.420	0.281	0.174	0.132
	$\pm 0.04$	$\pm 0.01$	$\pm 0.06$	$\pm 0.04$	$\pm 0.043$	$\pm 0.041$

For evaluation of lactone and carboxylate forms of SN-38, SN-38 (0.1  $\mu\text{M}$ ) was preincubated in phosphate buffer at pH 3.0 or 9.0, respectively, overnight before the uptake measurement. Then, uptake by *Xenopus* oocytes was measured at pH 6.5 or 8.0 for 10 min. Uptake by water-injected oocytes, OATP2B1-expressing oocytes and the OATP2B1-mediated uptake (shown as “Difference” in the Table) obtained subtraction of the former from the latter are each shown as the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 7-10).

## 第2節 イリノテカンによる遅発性下痢に対する予防薬の OATP2B1 阻害効果

CPT-11 は肝細胞内で活性体である SN-38 に変換され、さらに UGT1A1 によってグルクロン酸抱合され不活性な SN-38G が生成する。SN-38G は血中に直接的に戻るとともに胆汁を介して消化管内に排泄され、腸内細菌の  $\beta$ -グルクロニダーゼによって SN-38 に再変換される。CPT-11 による重篤な下痢は消化管組織内の SN-38 に起因すると考えられているため、下痢の支持療法として消化管腔内で  $\beta$ -グルクロニダーゼを産生する腸内細菌のセフェム系抗生物質 CFIX (Fig. 4-4 A) による除菌や  $\beta$ -グルクロニダーゼを阻害するバイカリン (Fig. 4-4 B) を含む漢方薬が用いられる<sup>74, 75)</sup>。CPT-11 による下痢は、その活性代謝物 SN-38 による小腸上皮細胞傷害で発生し、その機序は腸内細菌による脱抱合阻害のみで説明されている。小腸上皮細胞に障害を引き起こすためには、トポイソメラーゼ I 阻害活性を有する SN-38 が細胞内へ移行する必要がある、小腸上皮細胞内への SN-38 移行量の低下によって下痢が減少するとの報告がある<sup>100)</sup>。

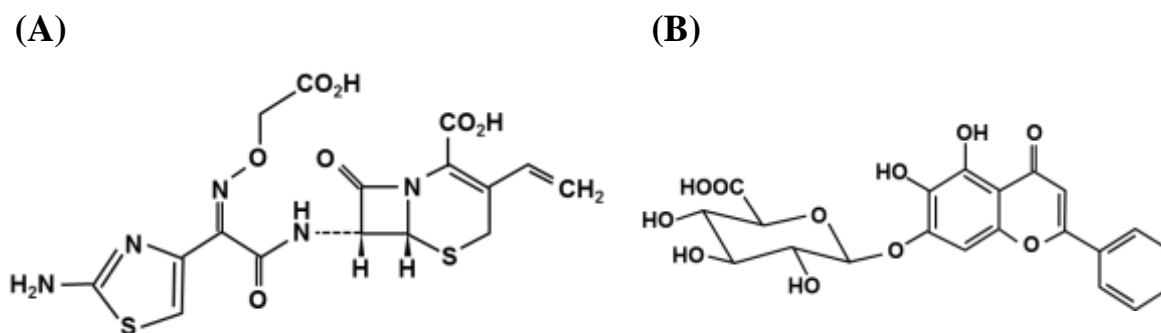


Fig. 4-4 Chemical structures of (A) cefixime and (B) baicalin

第 1 節では SN-38 の消化管動態機構として OATP2B1 の関与を示す結果がえられたことから、CFIX やバイカリンによる下痢予防効果は、OATP2B1 による SN-38 の輸送阻害によって説明できる可能性がある。そこで、OATP2B1 を介した輸送に対する CFIX とバイカリンの効果を評価した (Fig. 4-5)。CFIX とバイカリンのどちらも OATP2B1 を介した SN-38 の取り込みを濃度依存的に阻害した。SN-38 のラクトン体の取り込みに対する CFIX とバイカリンの  $IC_{50}$  値は、それぞれ  $1,303 \pm 389$  と  $9.41 \pm 2.83 \mu\text{M}$ 、カルボン酸体に対する  $IC_{50}$  値は、それぞれ  $2,078 \pm 1,040$  と  $97.7 \pm 22.3 \mu\text{M}$  であった。SN-38 のラクトン体はカルボン酸体よりも OATP2B1 阻害薬の影響を受けやすいと考えられる。

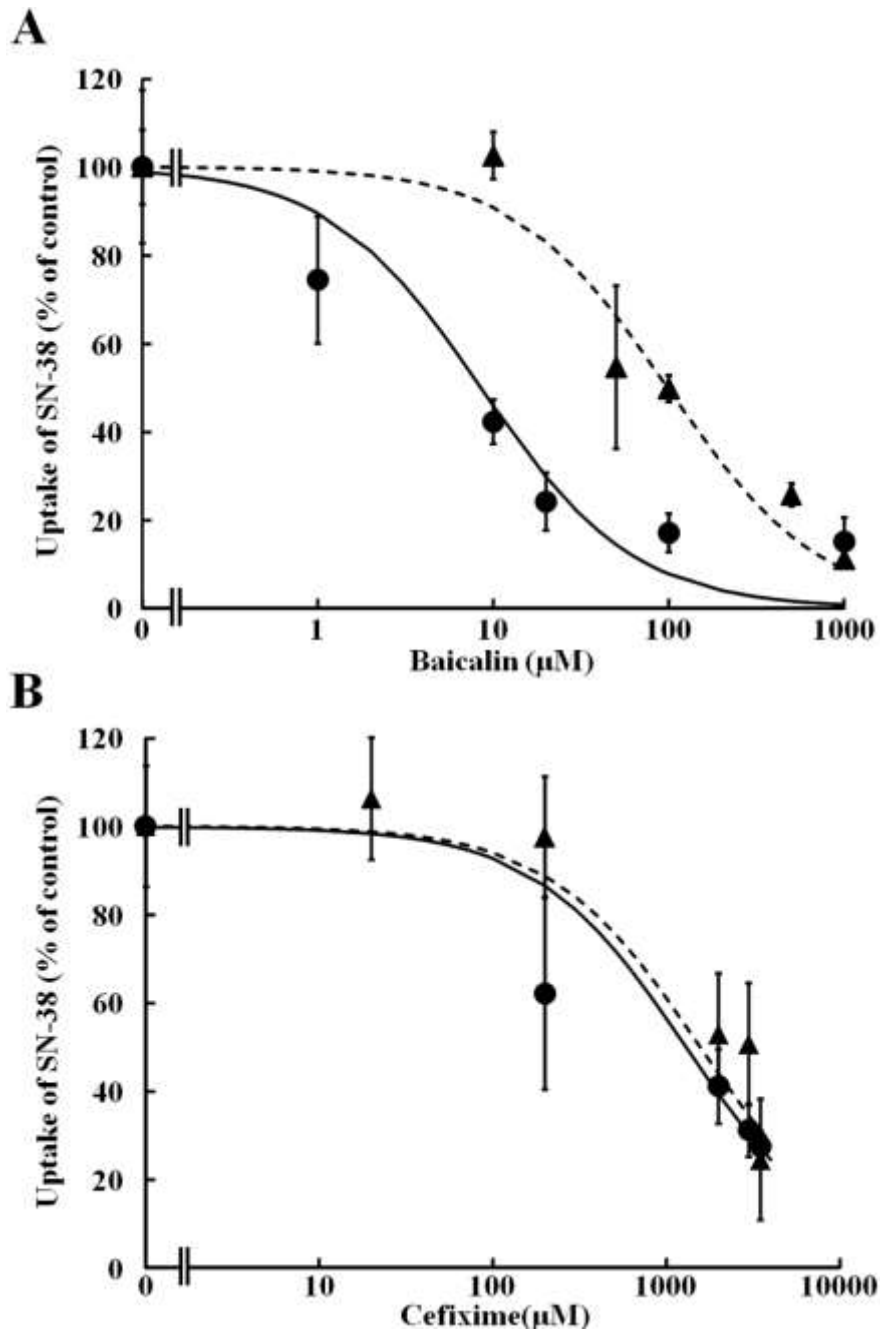


Fig. 4-5 Inhibitory effect of cefixime and baicalin on uptake of SN-38

in lactone or carboxylate form by *Xenopus* oocytes expressing OATP2B1

OATP2B1-mediated uptake of SN-38 (carboxylate form,  $0.1 \mu\text{M}$ ) was measured in the absence and presence of baicalin (A) or cefixime (B) for 10 min (lactone form: circle) or 30 min (carboxylate form: triangle) at pH 6.5. Data were corrected by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocytes and are shown as % of control uptake. Each result represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5-10$ ).

バイカリンを含む漢方薬である半夏瀉心湯は、1 回 2.5 g を服用するが、その中には約 12.7-38.1  $\mu\text{mol}$  のバイカリンを含んでいる。仮に 200 mL の水で服用した場合、単純にその濃度を計算すると 12.7-38.1  $\mu\text{M}$  になり、OATP2B1 に対する  $IC_{50}$  値と比較して低いことが示唆される。次に、CFIX は 8 mg/kg を 1 日 1 回経口投与するが、仮に体重が 10 kg の患児が服用する場合、80 mg (158  $\mu\text{mol}$ ) を服用することになる。小児では成人と異なり、少ない量の水で服用することが予測されるため、50-100 mL の水で服用した場合の濃度を計算すると 1.5-3 mM になり、OATP2B1 に対する  $IC_{50}$  値と比較して強いことが示唆される。したがって、バイカリンとCFIXは臨床用量で、OATP2B1を介したSN-38の取り込みを阻害することになる。大腸菌に対するCFIXのMICは4  $\mu\text{M}$ <sup>101)</sup>より小さく、 $\beta$ -グルクロニダーゼに対するバイカリンの  $K_m$  値は約 38  $\mu\text{M}$ <sup>93)</sup> であることから、CFIX やバイカリンの腸管内の濃度は、臨床用量で腸内殺菌や  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を十分に阻害することになる。以上より、CPT-11 投与による遅発性の下痢発現予防には、OATP2B1 を介した小腸上皮細胞への SN-38 の蓄積を減らすという新しい概念が提唱される。すなわち OATP2B1 阻害剤の投与によって CPT-11 による遅発性の下痢発現を予防できる可能性がある。

### 第3節 果汁による SN-38 の OATP2B1 輸送阻害

セフェム系抗生物質である CFIX による腸内殺菌は CPT-11 による下痢予防に有効であることが報告され<sup>76, 77)</sup>、実臨床で用いられている。しかし、腸内細菌叢への影響など副作用を伴うことが問題となっている。小児を対象とした場合、漢方薬には独特の味や臭いがあることと、1 回の服用量が多くなることから服薬アドヒアランスが低下する傾向にある。したがって、小児が飲みやすい、家族などが飲ませやすいことも支持療法薬を開発する上で重要な視点である。

健康成人がフェキソフェナジンを果汁で服用した時、水と比較して血漿中濃度が低下することを示す臨床試験結果があり<sup>88, 89)</sup>、その機序として OATP2B1 阻害が示されている<sup>85, 102)</sup>。トランスポーター活性の発達変化に関する情報自体が少なく、OATP2B1 活性の発達変化に関する情報は乏しいが、OATP2B1 を介する SN-38 の消化管吸収を果汁によって抑制することができれば、CPT-11 に由来する下痢発症機構として輸送体 OATP2B1 の関与を新しく提案することができる。また、本機構が裏付けられれば、下痢発症には小腸上皮細胞内濃度が重要となり、下痢抑制の新しい概念と抑制手法を提唱できる。特に、果汁を下痢予防に利用することができれば、併用薬による副作用や薬嫌いの小児にとって福音となる。

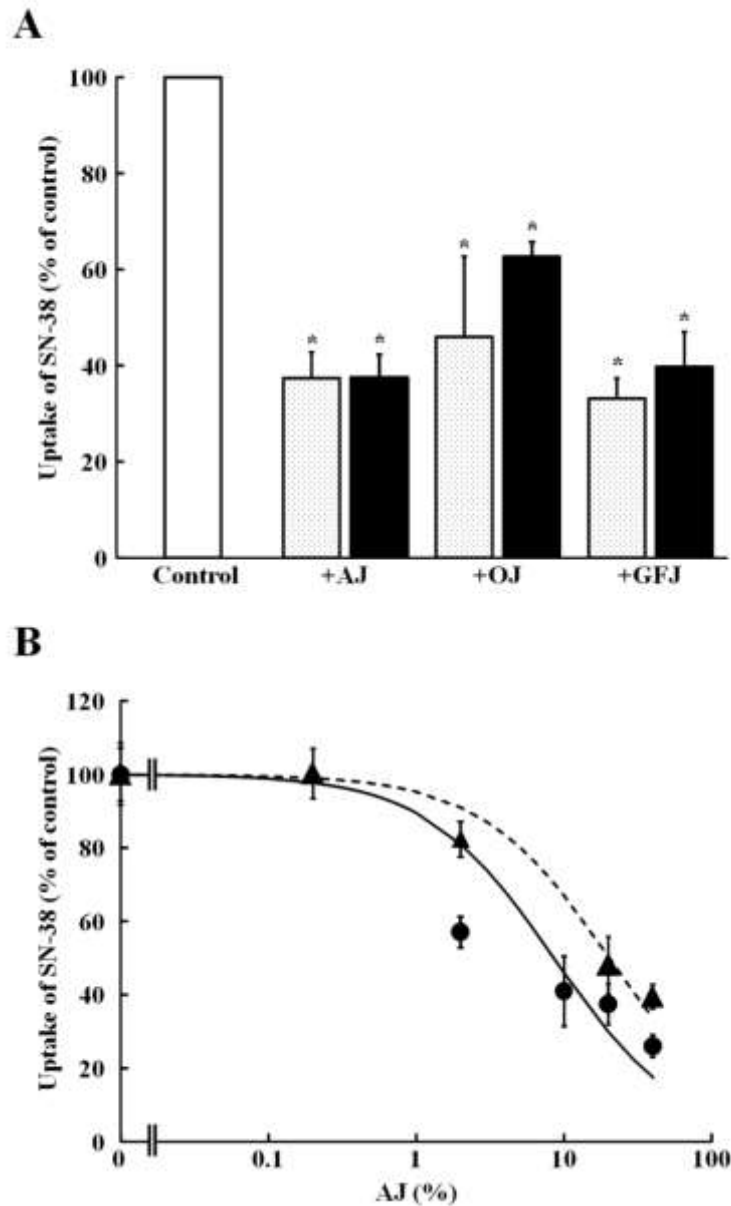


Fig. 4-6 Inhibitory effect of AJ, orange juice (OJ), and grapefruit juice (GFJ) on OATP2B1-mediated SN-38 uptake

Uptake of lactone form (dotted column) and carboxylate form (closed column) of SN-38 (0.1  $\mu$ M) by OATP2B1 was measured in the absence and presence of AJ, orange juice, or grapefruit juice at 20% dilution. (B) Concentration-dependence of the inhibitory effect of AJ on OATP2B1-mediated uptake of lactone form (circle) or carboxylate form (triangle) of SN-38 (0.1  $\mu$ M) was examined. Uptakes of lactone or carboxylate forms of SN-38 were measured for 10 min or 30 min, respectively. Data were corrected by subtracting the uptake by water-injected oocytes from that by OATP2B1 cRNA-injected oocytes. Each result represents the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5-10).



そこで、リンゴ果汁 (AJ)、グレープフルーツ果汁 (GJ)、オレンジ果汁 (OJ) による OATP2B1 を介した SN-38 の取り込み阻害効果を評価した (Fig. 4-6 A)。3 種類の果汁すべてで OATP2B1 を介した SN-38 の取り込みの有意な減少がみられた ( $P < 0.05$ )。次に、AJ の阻害特性を評価するため、AJ の濃度を 0.2% から 40% に変え、濃度依存性と  $IC_{50}$  値の算出を行った。SN-38 の取り込みは、AJ によって濃度依存的に減少し、ラクトン体とカルボン酸体の  $IC_{50}$  値は、それぞれ、 $6.93 \pm 2.11\%$  と  $20.3 \pm 3.67\%$  であった (Fig. 4-6 B)。AJ による OATP2B1 を介した SN-38 の輸送阻害効果は、カルボン酸体よりもラクトン体がより影響を受けやすいことが示された。

AJ による OATP2B1 阻害には、競合阻害と持続的阻害の 2 つの機序が報告されているが<sup>90)</sup>、本検討では AJ による競合阻害のみを評価していることになる。生体内では、競合阻害だけでなく持続的阻害が加わり、AJ の服用は CPT-11 による遅発性の下痢に対する有望な支持療法となる可能性が考えられる。有効性を証明するためには臨床試験が必要になるが、実臨床ならびに日常生活で利用しているセフィキシムと AJ を利用するため、安全性プロファイルは良好である。CPT-11 は難治性小児固形がんに対して有効な医薬品であり、かつ、成人がんに対しても広く使用されているため、応用範囲は広く波及効果は大きい。本研究によって CPT-11 による重篤な下痢発現の予測法や新規下痢予防薬の臨床開発への発展が期待される。小児がんの治療では、患児と家族の QOL を向上させることも重要な要素であり、下痢の重症度や発現頻度を減らすことができれば、治療生活と学業の両立に貢献することになる。

#### 第4節 小括

CPT-11 による遅発性の下痢発現は、OATP2B1 輸送体を介した SN-38 の消化管組織細胞内蓄積が重要であり、OATP2B1 阻害が下痢抑制に有効であるという仮説を立て、基礎実験を行った。毒性発症の新しい規定因子に基づき、抗生剤や漢方薬を使用しなくても、果汁によって CPT-11 による遅発性の下痢を回避できるという仮説を立て検証を行った。さらに、果汁の下痢予防薬としての可能性について検討を行った。

- 1) CPT-11 の活性代謝物である SN-38 は、OATP2B1 によって輸送されることから消化管からの再吸収には小腸上皮細胞に発現する OATP2B1 が寄与することが示唆された。
- 2) SN-38 のラクトン体とカルボン酸体はどちらも OATP2B1 で輸送され、輸送活性は小腸の生理的 pH よりも酸性条件 (pH 6.5) で高かった。小腸粘膜微小環境 pH では OATP2B1 を介した輸送が促進されることが示唆された。
- 3) CFIX とバイカリンは、どちらも OATP2B1 を介した SN-38 の輸送を濃度依存的に阻害し、ラクトン体の  $IC_{50}$  値はそれぞれ  $1,303 \pm 389$  と  $9.41 \pm 2.83 \mu\text{M}$ 、カルボン酸体の  $IC_{50}$  値はそれぞれ  $2,078 \pm 1,040$  と  $97.7 \pm 22.3 \mu\text{M}$  であった。臨床用量で OATP2B1 活性を阻害することが確認できた。
- 4) AJ は、OATP2B1 を介した SN-38 の輸送を濃度依存的に阻害し、ラクトン体とカルボン酸体の  $IC_{50}$  値は、それぞれ、 $6.93 \pm 2.11\%$  と  $20.3 \pm 3.67\%$  であった。AJ によって OATP2B1 を介した SN-38 の消化管組織細胞内蓄積が抑制される可能性が示唆された。

以上の結果より、CPT-11 に由来する下痢発症機序として輸送体 OATP2B1 が関与するという仮説を裏付ける結果が得られた。さらに、AJ が CPT-11 による遅発性の下痢予防に有効である可能性が示唆された。小児固形がんに対して CPT-11 を投与する場合、下痢の支持療法として AJ の有効性を検討する探索的臨床試験を行う意義や価値を見出すことができた。

## 第 5 章 結論

抗悪性腫瘍薬には、作用機序や由来などによって細胞障害性抗がん薬と分子標的薬に大別することができる。細胞障害性抗がん薬は、有効域と毒性域の差が小さく、有効性を期待する用量でも重篤な副作用を発現するため支持療法は必要不可欠である。一方、分子標的治療薬は、手足皮膚反応やざ瘡様皮疹などの皮膚症状や高血圧など、従来にはなかった重篤な副作用が発現することもあるため、分子標的治療薬特有の支持療法が必要になっている。本研究では、小児がん患者やその家族の QOL 向上を目指し、最適な支持療法を提案することを目的とした。

小児は成人に向けての成長過程であるため、年齢によって体重や薬物動態などが多様であり、個別の対応が必要である。そのため医薬品毎に特徴的な副作用を適切に管理するためには、小児がん治療の支持療法を同時に開発する必要がある。しかし、小児がんは成人がんと比較して患者数が圧倒的に少なく、そのため細分化された疾患群において新規治療法を開発することは容易ではない。そのため経験的な少数例の検討を積み重ね、実臨床に応用していくことが重要である。本研究では、イホスファミドとシクロホスファミドによる出血性膀胱炎に注目し、レトロスペクティブに両医薬品の支持療法を調査することによって、出血性膀胱炎の危険因子や効果的な予防法について検討した。次に、CPT-11 による下痢は、胆汁中に排泄された活性代謝物 SN-38 のグルクロン酸抱合体が腸内細菌により脱抱合されて生成する SN-38 に起因するため、下痢予防薬として併用される漢方薬や抗菌薬は酵素阻害によると考えられている。しかし、下痢発症には小腸上皮細胞に存在する OATP2B1 トランスポーターを介する SN-38 の吸収機構が重要であるという仮説のもと、OATP2B1 阻害活性を有する果汁が下痢予防薬に利用可能か検討した。

第 2 章では、イホスファミドによる出血性膀胱炎の支持療法について検討した。まず、イホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子をレトロスペクティブに検討した。その結果、イホス

ファミド 1 日投与量が出血性膀胱炎発現の危険因子になることが示唆された。イホスファミド 1 日投与量が  $2.0 \text{ g/m}^2$  を超える場合、出血性膀胱炎予防に輸液流量、メスナ投与量の増量やメスナ持続投与を考慮する必要があることがわかった。出血性膀胱炎予防に大量輸液は有効だが、夜間の排尿回数が増えると不眠などによる QOL 低下や小児の場合は夜尿の原因ともなる。しかし、夜間の輸液を減らすだけでこれらの改善が期待でき、実際、出血性膀胱炎の発現頻度に影響はみられなかったため、小児患者の QOL を改善する有効な方法になる可能性がある。その有効性について臨床試験によって検証する必要がある。

第 3 章では、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の支持療法について検討した。まず、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎の危険因子をレトロスペクティブに検討したが、危険因子について同定することはできなかった。しかし、通常の化学療法では、小児および若年成人におけるシクロホスファミドによる出血性膀胱炎の出現頻度は少なく、輸液による強制利尿とメスナ投与によって予防できる可能性があることが示唆された。化学療法レジメンによってシクロホスファミドの投与量や投与方法が異なるため、シクロホスファミドによる出血性膀胱炎に対する支持療法は、シクロホスファミドの投与方法や投与量による使い分けを考慮する必要があることが示唆された。さらに、小児固形がんに対してシクロホスファミドを  $1,500 \text{ mg/m}^2$  以上投与する場合には、出血性膀胱炎に対する支持療法は造血幹細胞移植時の前処置に準じ、 $1,500 \text{ mg/m}^2$  未満の場合にはメスナ投与にかかわらず輸液  $125 \text{ mL/m}^2/\text{h}$  を投与することが目安になることがわかった。

第 4 章では、CPT-11 投与に伴う下痢の原因となる活性代謝物 SN-38 が OATP2B1 の基質になり、OATP2B1 は果汁によって阻害されるため、OATP2B1 阻害が下痢抑制に有効であるという仮説を立て、基礎実験を行った。CPT-11 の活性代謝物である SN-38 は、OATP2B1 によって輸送されることから消化管からの再吸収には小腸上皮細胞に発現する OATP2B1 が寄与していることが示唆された。さらに、SN-38 のラクトン体とカルボン酸体はどちらも OATP2B1 で輸送され、輸送活性は小腸の生理的 pH よりも酸性条件 (pH 6.5) で高いことから小腸粘膜

微小環境 pH では OATP2B1 を介した輸送が促進されることが示唆された。ただし、トランスポーター活性の発達変化に関する情報自体が少なく、OATP2B1 活性の発達変化を明らかにしていくことが今後の課題となる。次に、毒性発症の新しい規定因子に基づき、抗生剤や漢方薬を使用しなくても、果汁によって CPT-11 による遅発性の下痢を回避できるという仮説を立て検証を行った。CFIX とバイカリンは、どちらも OATP2B1 を介した SN-38 の輸送を濃度依存的に阻害することと臨床用量で OATP2B1 活性を阻害することが確認できた。リンゴ果汁は、OATP2B1 を介した SN-38 の輸送を濃度依存的に阻害するためリンゴ果汁によって OATP2B1 を介した SN-38 の消化管組織細胞内蓄積が抑制される可能性が示唆された。

以上のように、本研究では、臨床試験によるエビデンス創出の困難な領域に目を向け、経験的な少数例の検討を積み重ね、その中から小児がん患者やその家族の QOL 向上につながる支持療法を提案することに取り組んだ。その過程で、臨床試験で検証していく必要はあるが、イホスファミドとシクロホスファミドの最適な支持療法につながる提案を行うことに成功した。そして、臨床上遭遇した疑問点の解決にむけて、基礎検討を行うことでメカニズム解明と臨床応用を試みた。CPT-11 による新規下痢発現機構解明につなげるとともに、CPT-11 投与患者を対象に新規下痢予防方法としてリンゴ果汁服用の有効性を検証する探索的臨床試験を行う意義や価値を見出すことができた。今後は、本研究で得られた結果に基づく、臨床試験を計画し、支持療法の有効性や QOL 向上への寄与を検証していく必要がある。

## 第 6 章 実験方法

### 第 1 節 「OATP2B1 機能調節によるイリノテカンによる新規消化管毒性回避方法の提案」に関する実験

#### (1) 実験材料

SN-38 はアブカム (株) (Cambridge) から、baicalin と gentamicin は和光純薬 (株) (大阪)、アフリカツメガエルはカトーS カガク (千葉) から購入した。Cefixime はアステラス製薬 (株) (大阪) から提供された。アップルジュース、オレンジジュース、及びグレープフルーツジュースは、金沢市内のスーパーマーケットでトロピカーナ® (果汁 100%) を購入した。他の化合物や試薬は、和光純薬 (株) (大阪)、シグマアルドリッチ (St. Louis)、または関東化学 (株) (東京) から購入した。

#### (2) 輸送実験

輸送実験は、アフリカツメガエルの卵母細胞にヒトの OATP2B1 遺伝子を導入した発現系を用いる確立した方法で行った<sup>83, 103)</sup>。アフリカツメガエルの卵母細胞は、OATP2B1 による SN-38 の輸送や蓄積を評価するために用い、SN-38 の定量は高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いた。mMESSAGE mMACHINE T7 キット (Ambion 社、Austin、Texas、米国) による cRNA の調製には、OATP2B1 の cDNA を含む pGEMHE ベクターを用いた。脱卵胞化した卵母細胞に cRNA 溶液 (0.5 µg/mL) または蒸留水 50 nL を注入し、gentamicin (50 µg/mL) を加えた modified Barth's solution (MBS, pH 7.4) 中で、18°C で 3 日間インキュベーションした。取り込み実験では、OATP2B1 発現卵母細胞を MBS (pH 7.4) を満たした 24well カルチャープレートに移し、25°C で 10 分間プレインキュベーション後、SN-38 を含む取り込み試験液 (MBS, pH 6.5) に交換し、取り込みを開始させた。取り込み開始前、SN-38 をリン酸

緩衝液 ( $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 9 または  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3) に一晩溶解させることで、それぞれ SN-38 のカルボン酸体とラクトン体を調製した。pH 8 での取り込み試験は、取り込み試験液の pH の調整は 10 mM HEPES と NaOH で行った。取り込み終了は、所定の時間経過後、氷冷した MBS で卵母細胞を 3 回洗浄することで反応を停止させた。アフリカツメガエルの卵母細胞に OATP2B1 が安定発現していることを確かめるため、各ロットで OATP2B1 の代表的な基質であるエストロン-3-硫酸の取り込みを測定し、適切な活性を示したロットをだけを試験に利用した。

### (3) 定量

卵母細胞は、50 mM リン酸緩衝液 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 3.0) 500  $\mu\text{M}$  中で超音波処理によりホモジネートし、内部標準物質として 10 nM カンプトテシン 50  $\mu\text{L}$  と最終濃度が 50 % になるようにメタノールを加えた。遠心分離 (15,000 rpm、4°C、15 分) し、上清 400  $\mu\text{L}$  を減圧乾燥させ、HPLC で測定するため沈渣を移動相に溶解した。SN-38 の濃度 (カルボン酸体とラクトン体の合計) は、蛍光検出器付 HPLC (JASCO LC-2000 plus series、JASCO 社、東京) によって測定した。HPLC システムには 20  $\mu\text{L}$  の試料を注入した。分析カラムには、Mightysil RP-18 GP カラム (250 mm  $\times$  4.6 mm、関東化学 (株)、東京) を用い、カラム温度は 40°C、移動相は 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.5) / アセトニトリル = 70:30 v/v、流速は 1.0 mL/min、蛍光検出器の励起光及び蛍光の波長はそれぞれ 375 nm と 560 nm を用いた。

### (4) 取り込み量の測定

取り込みは、SN-38 の取り込み量 (pmol/oocyte) または cell-to-medium ratio ( $\mu\text{L}/\text{mg}$  protein) で示し、OATP2B1 を介した取り込みは、OATP2B1 の cRNA を注入した卵母細胞を用いた時の値から蒸留水を注入した時の値を引くことによって算出した。最小二乗法による速度パラメーターの算出には KaleidaGraph プログラム (Synergy Software 社、Reading、



Pennsylvania、米国) を用いた。 $IC_{50}$  値は式 (1) により計算した。

$$\% \text{ of control} = 100 \times \left( 1 - \frac{I}{IC_{50} + I} \right) \cdots \text{式 (1)}$$

取り込み試験液の SN-38 調製濃度 SN-38 の取り込み量の平均値と標準誤差を算出し、統計学的有意差検定は、Student's *t*-test を用い、*P* 値が 0.05 未満のとき、統計的有意差があるものとした。

## 第 7 章 引用文献

1. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*. 2005, 103: 1457-1467.
2. Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, Pritchard J, Malpas JS, Baker AR, Kirkpatrick JA, Ayala AG, Shuster JJ, Abelson HT, Simone JV, Vietti TJ. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*. 1986, 314: 1600-1606.
3. Donaldson SS, Meza J, Breneman JC, Crist WM, Laurie F, Qualman SJ, Wharam M; Children's Oncology Group Soft Tissue Sarcoma Committee (formerly Intergroup Rhabdomyosarcoma Group) representing the Children's Oncology Group and the Quality Assurance Review Center. Results from the IRS-IV randomized trial of hyperfractionated radiotherapy in children with rhabdomyosarcoma--a report from the IRSG. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001, 51: 718-728.
4. Donaldson SS, Anderson JR. Rhabdomyosarcoma: many similarities, a few philosophical differences. *J Clin Oncol*. 2005, 23: 2586-2587.
5. Stevens MC, Rey A, Bouvet N, Ellershaw C, Flamant F, Habrand JL, Marsden HB, Martelli H, Sanchez de Toledo J, Spicer RD, Spooner D, Terrier-Lacombe MJ, van Unnik A, Oberlin O. Treatment of nonmetastatic rhabdomyosarcoma in childhood and adolescence: third study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOP Malignant

Mesenchymal Tumor 89. J Clin Oncol. 2005, 23: 2618-2628.

6. Berg SL, Grisell DL, DeLaney TF, Balis FM. Principles of treatment of pediatric solid tumors. Pediatr Clin North Am. 1991, 38: 249-267.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016, 66: 7-30.
8. Haupt R, Garaventa A, Gambini C, Parodi S, Cangemi G, Casale F, Viscardi E, Bianchi M, Prete A, Jenkner A, Luksch R, Di Cataldo A, Favre C, D'Angelo P, Zanazzo GA, Arcamone G, Izzi GC, Gigliotti AR, Pastore G, De Bernardi B. Improved survival of children with neuroblastoma between 1979 and 2005: a report of the Italian Neuroblastoma Registry. J Clin Oncol. 2010, 28: 2331-2338.
9. Deren JS. Development of structure and function in the fetal and newborn stomach. Am J Clin Nutr. 1971, 24: 144-159.
10. Anderson BJ, van Lingen RA, Hansen TG, Lin YC, Holford NH. Acetaminophen developmental pharmacokinetics in premature neonates and infants: a pooled population analysis. Anesthesiology. 2002, 96: 1336-1345.
11. McNamara PJ, Alcorn J. Protein binding predictions in infants. AAPS PharmSci. 2002, 4: 19-26.
12. Lacroix D, Sonnier M, Moncion A, Cheron G, Cresteil T. Expression of CYP3A in the

human liver--evidence that the shift between CYP3A7 and CYP3A4 occurs immediately after birth. *Eur J Biochem.* 1997, 247: 625-634.

13. Stevens JC, Hines RN, Gu C, Koukouritaki SB, Manro JR, Tandler PJ, Zaya MJ. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 307: 573-582.
14. Harrison MR, Golbus MS, Filly RA, Nakayama DK, Callen PW, de Lorimier AA, Hricak H. Management of the fetus with congenital hydronephrosis. *J Pediatr Surg.* 1982, 17: 728-427.
15. Aperia A, Broberger O, Thodenius K, Zetterström R. Development of renal control of salt and fluid homeostasis during the first year of life. *Acta Paediatr Scand.* 1975, 64: 393-398.
16. Hudson MM, Ness KK, Gurney JG, Mulrooney DA, Chemaitilly W, Krull KR, Green DM, Armstrong GT, Nottage KA, Jones KE, Sklar CA, Srivastava DK, Robison LL. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA.* 2013, 309: 2371-2381.
17. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med.* 2003, 348: 694-701.

18. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, Breneman J, Qualman SJ, Wiener E, Wharam M, Lobe T, Webber B, Maurer HM, Donaldson SS. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol.* 2001, 19: 3091-3102.
19. Kushner BH, Modak S, Kramer K, Basu EM, Roberts SS, Cheung NK. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide for neuroblastoma: a high-dose salvage regimen and review of the literature. *Cancer.* 2013, 119: 665-671.
20. Antoneli CB, Steinhorst F, de Cássia Braga Ribeiro K, Novaes PE, Chojniak MM, Arias V, de Camargo B. Extraocular retinoblastoma: a 13-year experience. *Cancer.* 2003, 98: 1292-1298.
21. von Schweinitz D, Kraus JA, Albrecht S, Koch A, Fuchs J, Pietsch T. Prognostic impact of molecular genetic alterations in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2002, 38: 104-108.
22. Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, Malogolowkin M, Haase GM, Grundy P, Coppes MJ. Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. *Lancet Oncol.* 2004, 5: 37-46.
23. Kaijser GP, Korst A, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJ. The analysis of ifosfamide and its metabolites (review). *Anticancer Res.* 1993, 13: 1311-1324.
24. Brock N, Pohl J, Stekar J. Studies on the urotoxicity of oxazaphosphorine cytostatics and

- its prevention. 2. Comparative study on the uroprotective efficacy of thiols and other sulfur compounds. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1981, 17: 1155-1163.
25. Brock N, Pohl J, Stekar J. Detoxification of urotoxic oxazaphosphorines by sulfhydryl compounds. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1981, 100: 311-320.
  26. Brade WP, Herdrich K, Varini M. Ifosfamide--pharmacology, safety and therapeutic potential. *Cancer Treat Rev.* 1985, 12: 1-47.
  27. Hensley ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, Cohen GI, Emami B, Gradishar WJ, Mitchell RB, Thigpen JT, Trotti A 3rd, von Hoff D, Schuchter LM. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. *J Clin Oncol.* 2009, 27: 127-145.
  28. Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, Gradishar WJ, Green DM, Langdon RJ Jr, Mitchell RB, Negrin R, Szatrowski TP, Thigpen JT, Von Hoff D, Wasserman TH, Winer EP, Pfister DG. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol.* 1999, 17: 3333-3355.
  29. Corman JM, McClure D, Pritchett R, Kozlowski P, Hampson NB. Treatment of radiation induced hemorrhagic cystitis with hyperbaric oxygen. *J Urol.* 2003, 169: 2200-2202.

30. Hassan Z, Remberger M, Svenberg P, Elbander M, Omazic B, Mattsson J, Conrad R, Svahn BM, Ahlgren A, Sairafi D, Aschan J, Le Blanc K, Barkholt L, Ringdén O. Hemorrhagic cystitis: a retrospective single-center survey. *Clin Transplant*. 2007, 21: 659-667.
31. Riachy E, Krauel L, Rich BS, McEvoy MP, Honeyman JN, Boulad F, Wolden SL, Herr HW, La Quaglia MP. Risk factors and predictors of severity score and complications of pediatric hemorrhagic cystitis. *J Urol*. 2014, 191: 186-192.
32. Decker DB, Karam JA, Wilcox DT. Pediatric hemorrhagic cystitis. *J Pediatr Urol*. 2009, 5: 254-264.
33. Lukasewycz SJ, Smith AR, Rambachan A, MacMillan ML, Lewis JM, Shukla AR. Intractable hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation--is there a role for early urinary diversion in children? *J Urol*. 2012, 188: 242-246.
34. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*. 1987, 317: 1098.
35. Droller MJ, Saral R, Santos G. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Urology*. 1982, 20: 256-258.
36. Goel AK, Rao MS, Bhagwat AG, Vaidyanathan S, Goswami AK, Sen TK. Intravesical irrigation with alum for the control of massive bladder hemorrhage. *J Urol*. 1985, 133: 956-957.

37. Jerkins GR, Noe HN, Hill DE. An unusual complication of silver nitrate treatment of hemorrhagic cystitis: case report. *J Urol.* 1986, 136: 456-458.
38. Donahue LA, Frank IN. Intravesical formalin for hemorrhagic cystitis: analysis of therapy. *J Urol.* 1989, 141: 809-812.
39. Ippoliti C, Przepiorka D, Mehra R, Neumann J, Wood J, Claxton D, Gajewski J, Khouri I, van Besien K, Andersson B, Deisseroth A, Dinney C. Intravesicular carboprost for the treatment of hemorrhagic cystitis after marrow transplantation. *Urology.* 1995, 46: 811-815.
40. deVries CR, Freiha FS. Hemorrhagic cystitis: a review. *J Urol.* 1990, 143: 1-9.
41. Allen LM, Creaven PJ, Nelson RL. Studies on the human pharmacokinetics of isophosphamide (NSC-109724). *Cancer Treat Rep.* 1976, 60: 451-458.
42. Goren MP, Houle JM, Bush DA, Li JT, Newman CE, Brade WP. Similar bioavailability of single-dose oral and intravenous mesna in the blood and urine of healthy human subjects. *Clin Cancer Res.* 1998, 4: 2313-2320.
43. Ladenstein R, Valteau-Couanet D, Brock P, Yaniv I, Castel V, Laureys G, Malis J, Papadakis V, Lacerda A, Ruud E, Kogner P, Garami M, Balwierz W, Schroeder H, Beck-Popovic M, Schreier G, Machin D, Pötschger U, Pearson A. Randomized Trial of prophylactic granulocyte colony-stimulating factor during rapid COJEC induction in pediatric patients with high-risk neuroblastoma: the European HR-NBL1/SIOPEN study. *J*



Clin Oncol. 2010, 28: 3516-3524.

44. Schwartzman E, Chantada G, Fandiño A, de Dávila MT, Raslawski E, Manzitti J. Results of a stage-based protocol for the treatment of retinoblastoma. *J Clin Oncol.* 1996, 14: 1532-1536.
45. Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hassan M, Rane A. Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J.* 2003, 3: 53-61.
46. Griskevicius L, Yasar U, Sandberg M, Hidestrand M, Eliasson E, Tybring G, Hassan M, Dahl ML. Bioactivation of cyclophosphamide: the role of polymorphic CYP2C enzymes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003, 59: 103-109.
47. Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos.* 1999, 27: 655-666.
48. Fleming RA. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy.* 1997, 17: 146S-154S.
49. Baker KS, Anderson JR, Link MP, Grier HE, Qualman SJ, Maurer HM, Breneman JC, Wiener ES, Crist WM. Benefit of intensified therapy for patients with local or regional

embryonal rhabdomyosarcoma: results from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV.  
J Clin Oncol. 2000, 18: 2427-2434.

50. Children's Oncology Group. Supportive Care of Children with Cancer, 3rd ed. Baltimore:  
Johns Hopkins University Press, 2004, pp. 100-148.

51. Stillwell TJ, Benson RC Jr, Burgert EO Jr. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic  
cystitis in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol. 1988, 6: 76-82.

52. Stillwell TJ, Benson RC Jr. Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. A  
review of 100 patients. Cancer. 1988, 61: 451-457.

53. Nakajima M, Komagata S, Fujiki Y, Kanada Y, Ebi H, Itoh K, Mukai H, Yokoi T,  
Minami H. Genetic polymorphisms of CYP2B6 affect the  
pharmacokinetics/pharmacodynamics of cyclophosphamide in Japanese cancer  
patients. Pharmacogenet Genomics. 2007, 17: 431-445.

54. Shu W, Guan S, Yang X, Liang L, Li J, Chen Z, Zhang Y, Chen L, Wang X, Huang  
M. Genetic markers in CYP2C19 and CYP2B6 for prediction of

cyclophosphamide's 4-hydroxylation, efficacy and side effects in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Clin Pharmacol*. 2016, 81: 327-340.

55. Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, Filion A, Bittencourt H, Silva W Jr, Vilela G, Zanette DL, Ferry C, Larghero J, Devergie A, Ribaud P, Skvortsova Y, Tamouza R, Gluckman E, Socie G, Zago MA. Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. *Leukemia*. 2009, 23: 545-556.
56. Bagley CM Jr, Bostick FW, DeVita VT Jr. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res*. 1973, 33: 226-233.
57. Shepherd JD, Pringle LE, Barnett MJ, Klingemann HG, Reece DE, Phillips GL. Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*. 1991, 9: 2016-2020.
58. Ballen KK, Becker P, Levebvre K, Emmons R, Lee K, Levy W, Stewart FM, Quesenberry P, Lowry P. Safety and cost of hyperhydration for the prevention of hemorrhagic cystitis in bone marrow transplant recipients. *Oncology*. 1999, 57: 287-292.

59. Fuchs J, Rydzynski J, Von Schweinitz D, Bode U, Hecker H, Weinel P, Bürger D, Harms D, Erttmann R, Oldhafer K, Mildenerger H; Study Committee of the Cooperative Pediatric Liver Tumor Study Hb 94 for the German Society for Pediatric Oncology and Hematology. Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94. *Cancer*. 2002, 95: 172-182.
60. Bisogno G, Riccardi R, Ruggiero A, Arcamone G, Prete A, Surico G, Provenzi M, Bertolini P, Paolucci P, Carli M. Phase II study of a protracted irinotecan schedule in children with refractory or recurrent soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2006, 106: 703-707.
61. Bomgaars LR, Bernstein M, Krailo M, Kadota R, Das S, Chen Z, Adamson PC, Blaney SM. Phase II trial of irinotecan in children with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2007, 25: 4622-4627.
62. Vassal G, Couanet D, Stockdale E, Geoffray A, Geoerger B, Orbach D, Pichon F, Gentet JC, Picton S, Bergeron C, Cisar L, Assadourian S, Morland B; French Society of Pediatric Oncology; United Kingdom Children's Cancer Study Group. Phase II trial of irinotecan in children with relapsed or refractory rhabdomyosarcoma: a joint study of the French Society of Pediatric Oncology and the United Kingdom Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2007, 25: 356-361.
63. Vassal G, Giammarile F, Brooks M, Geoerger B, Couanet D, Michon J, Stockdale E, Schell M, Geoffray A, Gentet JC, Pichon F, Rubie H, Cisar L, Assadourian S, Morland B. A phase

II study of irinotecan in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a European cooperation of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique (SFOP) and the United Kingdom Children Cancer Study Group (UKCCSG). *Eur J Cancer*. 2008, 44: 2453-2460.

64. Mugishima H, Matsunaga T, Yagi K, Asami K, Mimaya J, Suita S, Kishimoto T, Sawada T, Tsuchida Y, Kaneko M. Phase I study of irinotecan in pediatric patients with malignant solid tumors. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002, 24: 94-100.
65. Osone S, Hosoi H, Tsuchiya K, Misawa A, Iehara T, Sugimoto T. Low-dose protracted irinotecan as a palliative chemotherapy for advanced neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008, 30: 853-856.
66. Shitara T, Shimada A, Hanada R, Matsunaga T, Kawa K, Mugishima H, Sugimoto T, Mimaya J, Manabe A, Tsurusawa M, Tsuchida Y. Irinotecan for children with relapsed solid tumors. *Pediatr Hematol Oncol*. 2006, 23: 103-110.
67. Pappo AS, Lyden E, Breitfeld P, Donaldson SS, Wiener E, Parham D, Crews KR, Houghton P, Meyer WH; Children's Oncology Group. Two consecutive phase II window trials of irinotecan alone or in combination with vincristine for the treatment of metastatic rhabdomyosarcoma: the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2007, 25: 362-369.
68. Casey DA, Wexler LH, Merchant MS, Chou AJ, Merola PR, Price AP, Meyers PA. Irinotecan and temozolomide for Ewing sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Pediatr Blood Cancer*. 2009, 53: 1029-1034.

69. Mascarenhas L, Lyden ER, Breitfeld PP, Walterhouse DO, Donaldson SS, Paidas CN, Parham DM, Anderson JR, Meyer WH, Hawkins DS. Randomized phase II window trial of two schedules of irinotecan with vincristine in patients with first relapse or progression of rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2010, 28: 4658-4663.
70. Bagatell R, London WB, Wagner LM, Voss SD, Stewart CF, Maris JM, Kretschmar C, Cohn SL. Phase II study of irinotecan and temozolomide in children with relapsed or refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2011, 29: 208-213.
71. Chabot GG. Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet.* 1997, 33: 245-259.
72. Di Paolo A, Bocci G, Danesi R, Del Tacca M. Clinical pharmacokinetics of irinotecan-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Curr Clin Pharmacol.* 2006, 1: 311-323.
73. Swami U, Goel S, Mani S. Therapeutic targeting of CPT-11 induced diarrhea: a case for prophylaxis. *Curr Drug Targets.* 2013, 14: 777-797.
74. Mori K, Kondo T, Kamiyama Y, Kano Y, Tominaga K. Preventive effect of Kampo medicine (Hangeshashin-to) against irinotecan-induced diarrhea in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003, 51: 403-406.

75. Takasuna K, Hagiwara T, Hirohashi M, Kato M, Nomura M, Nagai E, Yokoi T, Kamataki T. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer Res.* 1996, 56: 3752-3757.
76. Furman WL, Crews KR, Billups C, Wu J, Gajjar AJ, Daw NC, Patrick CC, Rodriguez-Galindo C, Stewart CF, Dome JS, Panetta JC, Houghton PJ, Santana VM. Cefixime allows greater dose escalation of oral irinotecan: a phase I study in pediatric patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol.* 2006, 24: 563-570.
77. McGregor LM, Stewart CF, Crews KR, Tagen M, Wozniak A, Wu J, McCarville MB, Navid F, Santana VM, Houghton PJ, Furman WL, Rodriguez-Galindo C. Dose escalation of intravenous irinotecan using oral cefpodoxime: a phase I study in pediatric patients with refractory solid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2012, 58: 372-379.
78. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos.* 2013, 34: 45-78.
79. Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I. Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* 2005, 33: 434-439.

80. Xiang X, Jada SR, Li HH, Fan L, Tham LS, Wong CI, Lee SC, Lim R, Zhou QY, Goh BC, Tan EH, Chowbay B. Pharmacogenetics of SLCO1B1 gene and the impact of \*1b and \*15 haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006, 16: 683-691.
81. Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 273: 251-260.
82. Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003, 306: 703-708.
83. Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004, 308: 438-445.
84. Gröer C, Brück S, Lai Y, Paulick A, Busemann A, Heidecke CD, Siegmund W, Oswald S. LC-MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *J Pharm Biomed Anal*. 2013, 85: 253-261.
85. Tamai I. Oral drug delivery utilizing intestinal OATP transporters. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012, 64: 508-514.



86. Tamai I, Nozawa T, Koshida M, Nezu J, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm Res.* 2001, 18: 1262-1269.
87. Noé J, Portmann R, Brun ME, Funk C. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1, and OATP1B3. *Drug Metab Dispos.* 2007, 35: 1308-1314.
88. Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002, 71: 11-20.
89. Imanaga J, Kotegawa T, Imai H, Tsutsumi K, Yoshizato T, Ohyama T, Shirasaka Y, Tamai I, Tateishi T, Ohashi K. The effects of the SLCO2B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. *Pharmacogenet Genomics.* 2011, 21: 84-93.
90. Shirasaka Y, Shichiri M, Murata Y, Mori T, Nakanishi T, Tamai I. Long-lasting inhibitory effect of apple and orange juices, but not grapefruit juice, on OATP2B1-mediated drug absorption. *Drug Metab Dispos.* 2013, 41: 615-621.
91. Shirasaka Y, Mori T, Murata Y, Nakanishi T, Tamai I. Substrate- and dose-dependent drug interactions with grapefruit juice caused by multiple binding sites on OATP2B1. *Pharm Res.* 2014, 31: 2035-2043.

92. Kobayashi K, Bouscarel B, Matsuzaki Y, Ceryak S, Kudoh S, Fromm H. pH-dependent uptake of irinotecan and its active metabolite, SN-38, by intestinal cells. *Int J Cancer*. 1999, 83: 491-496.
93. Ikegami T, Ha L, Arimori K, Latham P, Kobayashi K, Ceryak S, Matsuzaki Y, Bouscarel B. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res*. 2002, 62: 179-187.
94. Itoh T, Itagaki S, Sumi Y, Hirano T, Takemoto I, Iseki K. Uptake of irinotecan metabolite SN-38 by the human intestinal cell line Caco-2. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005, 55: 420-424.
95. Nakakariya M, Shimada T, Irokawa M, Maeda T, Tamai I. Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008, 23: 347-355.
96. Fujita K, Sugiura T, Okumura H, Umeda S, Nakamichi N, Watanabe Y, Suzuki H, Sunakawa Y, Shimada K, Kawara K, Sasaki Y, Kato Y. Direct inhibition and down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38, an active metabolite of irinotecan, in humans. *Pharm Res*. 2014, 31: 204-215.
97. Liman ER, Tytgat J, Hess P. Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*. 1992, 9: 861-871.

98. Debont T, Daenens P, Tytgat J. An improved fractionation and fast screening method for the identification of new and selective neurotoxins. *Neurosci Res.* 1996, 24: 201-206.
99. Fassberg J, Stella VJ. A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J Pharm Sci.* 1992, 81: 676-684.
100. Takeda Y, Kobayashi K, Akiyama Y, Soma T, Handa S, Kudoh S, Kudo K. Prevention of irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea by oral alkalization combined with control of defecation in cancer patients. *Int J Cancer.* 2001, 92: 269-275.
101. Neu HC, Chin NX, Labthavikul P. Comparative in vitro activity and  $\beta$ -lactamase stability of FR17027, a new orally active cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984, 26: 174-180.
102. Tamai I, Nakanishi T. OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. *Curr Opin Pharmacol.* 2013, 13: 859-863.
103. Shirasaka Y, Suzuki K, Nakanishi T, Tamai I. Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin mediated by organic anion transporting polypeptide. *Pharm Res.* 2010, 27: 2141-2149.

## 第8章 謝辞

本論文の作成にあたり、金沢大学 医薬保健薬研究域 薬学系 教授 玉井 郁巳博士の懇切なるご指導をいただきました。ここに深く感謝いたします。また、論文の内容に関して有益なご助言をいただいた金沢大学 医薬保健薬研究域 薬学系 准教授 中西 猛夫博士に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行する環境を整えてくださった、元国立がん研究センター中央病院 薬剤部 山本 弘史薬剤部長（現長崎大学病院 臨床研究センター長）、元国立がん研究センター中央病院 薬剤部 林 憲一薬剤部長（現独立行政法人医薬品医療機器総合機構 審議役）、ならびに国立がん研究センター中央病院 薬剤部 寺門 浩之薬剤部長に心よりお礼申し上げます。

国立がん研究センター中央病院 小児腫瘍科科長 小川 千登世先生、小児腫瘍科医長 熊本 忠史先生をはじめ小児腫瘍科の医師各位には、日頃より業務および研究における多大なご協力とご支援をいただきました。深く感謝いたします。

最後に、研究の遂行にあたり、ご協力いただいた、金沢大学大学院医保健学総合研究科博士課程の藤田 大地氏に厚く御礼申し上げます。

## 参考論文

1. Fujita D, Saito Y, Nakanishi T, Tamai I, Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)2B1 Contributes to Gastrointestinal Toxicity of Anticancer Drug SN-38, Active Metabolite of Irinotecan Hydrochloride, Drug Metab Dispos, 44: 1-7, 2016 January.
2. Saito Y, Kumamoto T, Makino Y, Tamai I, Ogawa C, Terakado H, A retrospective study of treatment and prophylaxis of ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in pediatric and adolescent and young adult (AYA) patients with solid tumors, Jpn J Clin Oncol, 46: 856-861, 2016 September.