

国際医療福祉大学審査学位論文(博士)

大学院薬学研究科博士課程

オキサリプラチン誘発性急性末梢神経障害
に対する
六味丸の効果および影響因子の探索

平成 30 年度

医療・生命薬学専攻

学籍番号：15R3002 氏名：清水 加奈子

研究指導教員：山田 治美

副研究指導教員：中村 裕義

オキサリプラチン誘発性急性末梢神経障害に対する六味丸の効果およびの影響因子の探索

15R3002 清水 加奈子

要旨

オキサリプラチン (L-OHP) の副作用である急性の末梢神経障害 (PN) は高頻度に発症し冷感過敏を特徴とするが、その有効な対処法や影響因子は未だ明確にされていない。本研究では、ラットにおいて PN に用いられる牛車腎気丸 (GJG) から 4 つの生薬を除いた六味丸 (RG) の冷感過敏に対する効果について検討した。次に、臨床における L-OHP による急性 PN 発症の影響因子についてカルテ調査を行った。その結果、ラットにおいて RG は L-OHP 投与により亢進した冷感受容体の *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現を抑制し、冷感過敏症状を改善した。また、臨床において 1 コース目で急性 PN を発症した群において初回投与量が有意に多いことを示した。さらに、L-OHP 高用量群において GJG を併用した患者の急性 PN 発症数が少ない傾向を示した。本研究の結果より、L-OHP 誘発性冷感過敏に対する有効成分を RG 構成生薬の 6 種に絞り込むことに成功し、L-OHP が高用量となる場合には急性 PN の発症リスクが高いことを示した。

キーワード：オキサリプラチン、末梢神経障害、六味丸、影響因子、初回投与量

Analysis of the effect of rokumigan on oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy and influence factors

15R3002 Kanako Shimizu

Abstract

The incidence of acute peripheral neuropathy (PN), which is an adverse effect of oxaliplatin (L-OHP), is high and characterized by cold hypersensitivity, but its effective measure and its influencing factors have not yet been clarified. In this study, in rats, we investigated the effect of rokumigan (RG) excluding four crude herbs from goshajinkigan (GJG) used for PN on cold hypersensitivity. Next, a clinical record study was conducted on the influential factors for the onset of L-OHP-induced acute PN. As a result, in rats, RG suppressed overexpression of *TRPM8* and *TRPA1 mRNA* by L-OHP administration, and improved symptoms of cold hypersensitivity. In addition, in clinical practice, it showed that the initial dose was significantly higher in the group that developed acute PN in the first course. Furthermore, in L-OHP high dose group, the number of patients acute PN onset with GJG co-treatment showed less tendency. Based on these results of this study, we succeeded in narrowing down the active ingredient against L-OHP-induced cold hypersensitivity to 6 kinds of RG constituting crude herbs, and showed that high dose of L-OHP increases the risk of acute PN.

Keywords: Oxaliplatin, Peripheral neuropathy, Rokumigan, Influencing factor, Initial dose

目 次

緒言.....	1
第1章 研究 1	
ラットにおけるオキサリプラチン誘発性冷感過敏に対する六味丸の効果	
第1節 背景・目的.....	5
第2節 方法.....	9
第3節 結果.....	16
第4節 考察.....	23
第2章 研究 2	
臨床におけるオキサリプラチン誘発性急性末梢神経障害に対する影響因子の探索	
第1節 背景・目的.....	26
第2節 方法.....	29
第3節 結果.....	33
第4節 考察.....	44
総括.....	48
出版目録.....	50
謝辞.....	51
引用文献.....	53

緒言

オキサリプラチン（oxaliplatin : L-OHP）は白金系抗ガン剤の一つであり、大腸がん、胃がんおよび膵臓がんのキードラッグ¹⁻³⁾として、FOLFOX4/6、FOLFIRINOX、SOX、CapeOXなどのレジメンで他の抗がん剤と組み合わせて使用されている。L-OHPはDNA塩基との架橋形成によるDNA合成阻害により抗悪性腫瘍効果を示すが、L-OHPの特徴的な副作用として末梢神経障害（peripheral neuropathy : PN）があり、発症時期や発症期間により急性PNと慢性PNに分けられる⁴⁾。

急性PNはオキサリプラチン投与直後から2～3日以内に発症し、冷感感受性が亢進し冷アロディニア冷感痛覚過敏状態となるため、冷感刺激によりしびれや痛みが誘発される。その症状は一過性であり14日以内には消失するが、L-OHPを投与した患者のほぼ全例に発症する^{5,6)}ため患者のQOLを低下させる大きな要因となっている。急性PN発症に対する影響因子については、現在の所、明確な関係を有する因子は確認されていない。一方、慢性PNは深部感覚喪失、感覚性運動失調および感覚性の機能障害が発症し、しびれや疼痛等の症状が14日以上持続する^{6,7)}。慢性PNの影響因子は累積投与量であり、用量依存的に症状の出現頻度、重症度が増すことが知られている。体表面積（BSA）あたりの累積投与量が850 mg/BSAを超えると10%の患者で、1,020 mg/BSAを超えると20%の患者で慢性PNが出現する⁸⁾。

早期の急性PNがその後の急性PNおよび慢性PNの発症率・重症度を予測する因子となる可能性についていくつかの報告がある^{9,10)}。PachmanらはL-OHP投与1コース目で急性PNを発症しなかった患者は、その後に慢性PNを発症してもその大部分は軽度であったと報告している

11)。また、Tanishima らは L-OHP の初回投与後 24 時間以内に急性 PN を発症した患者では、初回投与後 24 時間以内に急性 PN を発症しなかった患者に比べて、慢性 PN の発症率が高くなると報告しているが¹²⁾、急性 PN が慢性 PN の発症因子となるメカニズムについては明らかとなっていない。

これらの報告から、急性 PN の早期発症は、その後の急性 PN の重症度や慢性 PN の発症率に影響する可能性が示唆される。そのため、未だ解明されていない急性 PN の影響因子を調査し、早期の急性 PN の発症率を抑えることは L-OHP を含む化学療法を行う上で重要な課題となっている。

急性・慢性共に L-OHP 誘発性 PN に対して臨床で使用されているのは、牛車腎気丸 (gosyajinkigan : GJG)¹³⁾を始めとする、カルシウム (Ca) /マグネシウム (Mg)¹⁴⁻¹⁶⁾、デュロキシセチン¹⁷⁻¹⁸⁾、プレガバリン¹⁹⁾などの薬剤である。なお、2014 年の米国臨床腫瘍学会 (American Society of Clinical Oncology : ASCO) ガイドラインにおいて L-OHP やパクリタキセルなどの抗がん剤による副作用としての PN に対して、いずれの薬剤についても一貫した科学的根拠が不足しているため予防薬としての使用は推奨されないとしている¹⁷⁾。また、Smith らは CTCAE v3.0 グレード 1 以上の L-OHP またはタキサン系抗がん剤による PN を発症している患者 231 例を対象とし、治療薬としてデュロキシセチン使用した群ではプラセボ群と比較して有意に平均疼痛スコアが減少したことを報告している ($p = 0.003$)¹⁸⁾。この報告をもとに ASCO は治療薬として唯一デュロキシセチンに中等度のエビデンスがあるとしている¹⁷⁾。また日本において神経障害性疼痛の治療薬として保険適応があるのはプレガバリンおよびアミトリプチリンのみである。Nihei

らは L-OHP 誘発性 PN に対しプレガバリンを治療薬として使用した患者 27 例のうち、CTCAE v4.0 グレードが 1 段階以上低下した患者の割合は 40.7%であったと報告している¹⁹⁾。アミトリプチリンは帯状疱疹²⁰⁾や糖尿病性神経障害²¹⁾等による痛みやしびれに用いられており、ラットにおいてアミトリプチリンの L-OHP 誘発性 PN に対する効果は報告されているが²²⁾、ヒトにおいて有効であるとの報告はない。L-OHP 誘発性 PN に対する有効な予防法および治療方法は確立されておらず、急性または慢性 PN に対する使い分けも明確にされていない。この様に L-OHP 誘発性 PN が発症すると有効な対策がないことから、特に慢性 PN においては重症化すると投与量の減量や投与中止となる場合もあり、治療継続に支障をきたす大きな問題となっている。

GJG は L-OHP 誘発性 PN に対し、臨床において良く用いられる薬剤である。しかし、臨床における GJG の有効性については様々な報告がある。Fukazawa らは、FOLFOX6 療法を受けた患者における L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の効果を検討しており、GJG 併用群では非併用群と比較して PN の重症化が抑えられることを示した²³⁾。また、GJG 併用群では非併用群と比較して L-OHP 誘発性 PN の発症率が低いことを示し、GJG の併用が L-OHP 誘発性 PN に対し有効であると報告している²³⁾。一方、Oki らは、GENIUS 試験で FOLFOX 療法を受けた患者におけるグレード 2 以上の L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の効果を検討し、GJG 併用群では非併用群と比較して PN の発症率が高く、GJG は L-OHP 誘発性 PN に対し無効であると報告している²⁴⁾。このように、臨床における L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の効果については有効であるとの報告がある一方、無効であるとの報告もある。いずれの報告においても急性と慢性 PN の区別はしておらず、どちらに対して GJG が効果を示すのかについては明らかとなっていない。

L-OHP は体内でシュウ酸とジクロロ 1,2-ジアミノシクロヘキサン白金に代謝される。急性 PN の発症メカニズムとして、シュウ酸が Na⁺チャネルに作用し、膜電位の脱分極により Ca²⁺チャネルを開口、活性化 T 細胞核内因子 (nuclear factor of activated T-cell : NFAT) を核内へ移行させ、冷感受容体である TRPM8 の合成が促進されるために急性 PN が発症するとの仮説が提唱されている²⁵⁻²⁷⁾。また、冷感受容体である TRPM8 と同じ TRP ファミリーの一つである TRPA1 においても、L-OHP 誘発性急性 PN への関与が報告されている²⁶⁻²⁸⁾。一方、慢性 PN は、L-OHP が生体内で分解されて生じた白金が感覚神経細胞の核内に蓄積し、DNA との結合による細胞死を引き起こす事により発症するとの仮説が提唱されている⁷⁾。L-OHP 誘発性の急性 PN と慢性 PN ではその発症メカニズムが異なることから、それぞれに合った予防または治療薬の研究が必要である。

一方、ラットによる動物実験においては、L-OHP 誘発性急性 PN の特徴である冷感過敏に対して、GJG が有効であるという報告がなされている²⁹⁾。GJG は 10 種の生薬により構成されているが、そのうちいずれの生薬成分が有効性を示すのかを調べることにより、L-OHP 誘発性急性 PN に対する効率的な治療法の開発に繋がると考えられる。

そこで本研究では、まず GJG の構成生薬のうち L-OHP 誘発性急性 PN に有効な生薬成分の絞り込みを行うべく、L-OHP 誘発性冷感過敏モデルラットにおいて 10 種の GJG の構成生薬のうちの 6 種の生薬からなる六味丸 (Rokumigan : RG) の L-OHP 誘発性冷感過敏に対する効果を検討した。さらに、臨床において GJG を含む L-OHP 誘発性急性 PN 発症に対する影響因子の探索を行った。

第1章

研究 1「オキサリプラチン誘発性冷感過敏に対する六味丸の効果」

第1節 背景・目的

L-OHP 誘発性急性 PN の特徴は冷感刺激による感受性が亢進した冷感過敏症状である。温度的、機械的および化学的刺激等の様々な刺激を感知する侵害受容器である transient receptor potential (TRP) スーパーファミリーのうち、低温によって活性化される transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) および transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) は L-OHP 誘発性冷感過敏と関連することが報告されている²⁶⁾。Ta らは L-OHP を投与したマウスにおいて *TRPM8* または *TRPA1 mRNA* の発現が亢進したことを報告し²⁷⁾、Kawashiri らは、ラットにおいて Ca^{2+} チャネル阻害薬の投与により L-OHP 投与により過剰発現していた *TRPM8 mRNA* が抑制され、L-OHP 誘発性冷感過敏が抑制されたことを報告し、その機序として、L-OHP が DRG 細胞への Na^+ 及び Ca^{2+} イオンの流入を増加させ、活性化 T 細胞核因子 (NFAT) シグナルを活性化することにより *TRPM8 mRNA* 発現を誘導し、その合成を促進すると推測している²⁵⁾。さらに TRPA1 も細胞内 Ca^{2+} によって直接活性化されることが報告されている³⁰⁾。また、Kono らはヒトにおいて TRPM8 により感知されるメントールによる冷感刺激に対する感受性が、L-OHP 投与により亢進したことを報告し²⁷⁾、Zhao らはマウスにおいて、TRPA1 アンタゴニストの投与により L-OHP 誘発性冷感過敏が抑制されたことを報告している³¹⁾。Mizoguchi らはマウスにおいて L-OHP 投与により、DRG および足底皮膚のそれぞれについて *TRPM8 mRNA* およびタンパク質の発現レベルが増加し³²⁾、田口らはラットにおいて L-OHP 投与により、DRG

での TRPA1 タンパクの発現が増加することを報告している³³⁾。これらの報告から、L-OHP 投与により TRPM8 または TRPA1 の発現が増加することによって冷感感受性が亢進し、L-OHP 誘発性急性 PN の特徴である冷感過敏が誘発すると考えられている。

臨床において、GJG は L-OHP 誘発性 PN の予防または治療薬としてよく用いられる漢方薬である。Fukazawa らは、FOLFOX6 療法を受けた患者における L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の効果を検討しており、L-OHP 初回投与時から PN の予防のため GJG を併用した群では L-OHP のみを投与した群と比較して PN の重症化が抑えられていることを示した²³⁾。しかし一方で、Oki らは、FOLFOX6 療法を受けた患者において初回投与時から GJG を併用した群（GJG 併用群）と GJG を併用していない群（非併用群）について、グレード 2 以上の L-OHP 誘発性 PN の発症率を検討した結果、GJG 併用群は非併用群よりもグレード 2 以上の L-OHP 誘発性 PN の発症率が高く、GJG の L-OHP 誘発性 PN に対する予防効果は無いと報告している²⁴⁾。このように、L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の効果については有効とする報告がある一方無効との報告もある。さらに、L-OHP 誘発性 PN のうち急性 PN と慢性 PN を区別して GJG の効果を検討した報告はなく、臨床において GJG が急性または慢性 PN のどちらに有効性を示すのかについてはまだ明らかとなっていない。

一方、Kato らはラットにおいて、L-OHP 誘発性急性 PN の特徴である冷感過敏症状に対する GJG の効果について検討し、GJG は L-OHP によって過剰発現した *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現を抑制することにより L-OHP 誘発性冷感過敏を抑制したことを報告している²⁹⁾。このことから、GJG はヒトにおいても急性の PN に対して有効である可能性が考えられる。

GJG の構成生薬は牛膝、車前子、桂皮、附子、地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮である (図 1-A)。本研究では、この 10 種の構成生薬の中から L-OHP 誘発性冷感過敏に対する有効成分を絞り込むことにより、より有効な予防法や治療法を提案できると考えた。GJG の 10 種の生薬の中から牛膝、車前子を除いた漢方を八味地黄丸 (図 1-B)、さらに桂皮、附子を除いた六味丸 (RG) は、地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮の 6 種の生薬からなる漢方薬である (図 1-C)。RG は腎臓関連疾患の治療³⁴⁾や一部のうつ病患者の気力の減退に有効³⁵⁾であると報告され、疲れやすくて尿量減少または多尿で、時に口渴があるものの排尿困難、頻尿、むくみ、かゆみに適用されている。

一方、Tatsushima らはヒトにおいて、Ca²⁺チャネル阻害剤の投与により L-OHP 誘発性急性 PN が予防されることを報告し³⁶⁾、Satoh らはラットにおいて、RG が Ca²⁺チャネルを阻害することにより大動脈の血管拡張を誘導すると報告している³⁷⁾。従って、RG が Ca²⁺チャネル阻害作用を有することから、Ca²⁺チャネル阻害薬と同様に RG も L-OHP 誘発性急性 PN に対して効果を示す可能性が考えられた。さらに、RG の L-OHP 誘発性冷感過敏に対する効果を検討することは GJG の 10 種の生薬中の有効生薬の絞り込みにつながり、L-OHP 誘発性急性 PN の予防薬開発の一助となると考えた。

そこで本研究では、GJG による先行研究³¹⁾と同様に RG においても *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現を抑制することにより、L-OHP 誘発性冷感過敏を改善すると仮定し、L-OHP 誘発性冷感過敏モデルラットにおいて、冷感刺激に対する回避行動における RG の効果および後根神経節 (DRG) 中の *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現について検討を行った。

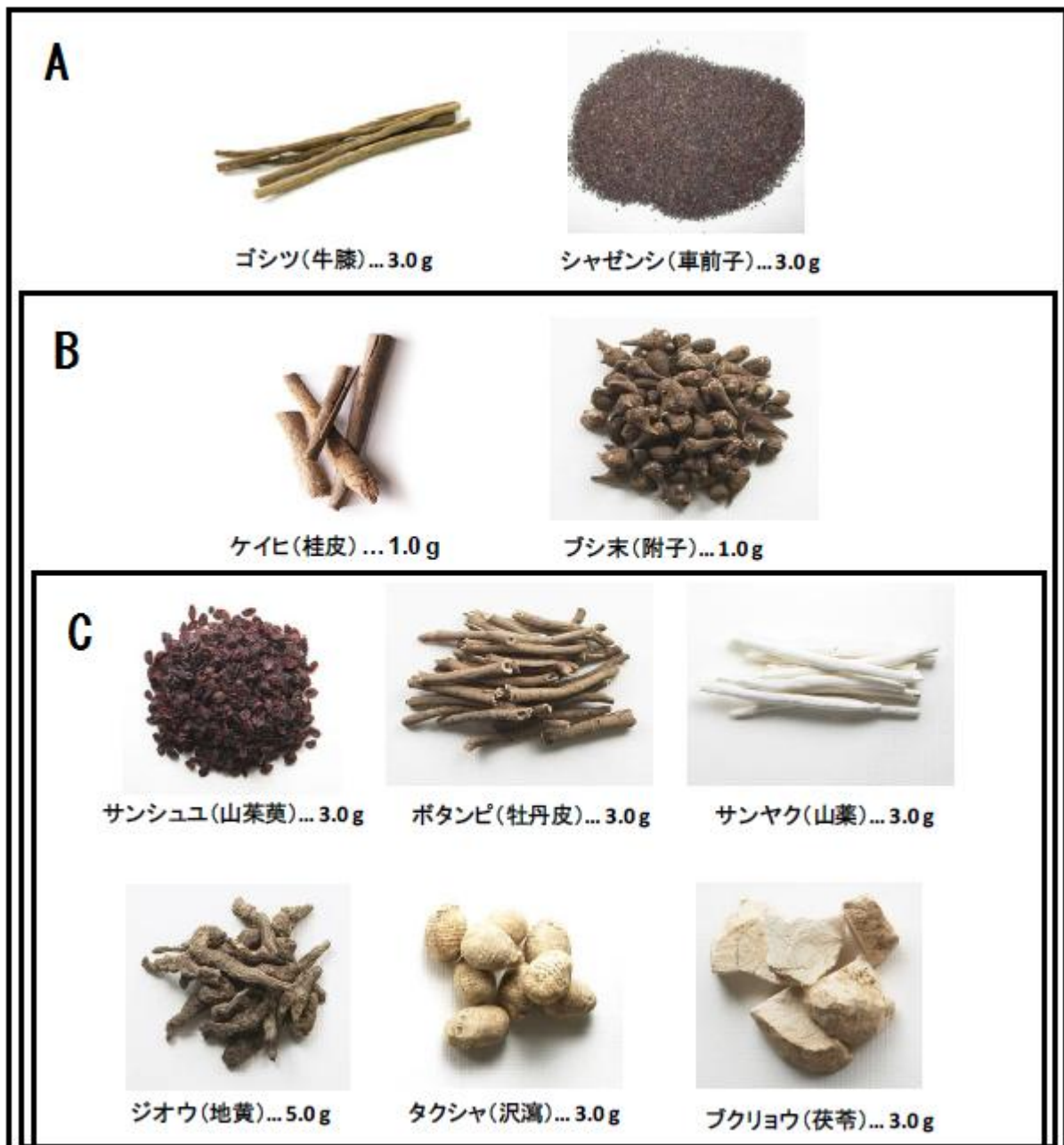


図 1 GJG の構成生薬とその関連漢方薬

GJG は牛膝、車前子、桂皮、附子、地黄、山茱萸、山藥、沢瀉、茯苓、牡丹皮の 10 種類の構成生薬からなる漢方薬である (図 1-A)。GJG の 10 種の生薬の中から牛膝、車前子を除いた八味地黄丸は、桂皮、附子、地黄、山茱萸、山藥、沢瀉、茯苓、牡丹皮の 8 種類の生薬で構成される (図 1-B)。八味地黄丸からさらに桂皮、附子を除いた六味丸 (RG) は、地黄、山茱萸、山藥、沢瀉、茯苓、牡丹皮の 6 種の生薬からなる漢方薬である (図 1-C)。

第2節 方法

2.1 動物

本研究では、雄性 Wistar-ST ラット（日本エスエルシー株式会社、宮城県、体重 110～140 g）を用いた。ラットは、12 時間の明/暗サイクル（点灯 7:00、消灯 19:00）で $23 \pm 1^\circ\text{C}$ の室温および $50 \pm 5\%$ の湿度で 1 ケージあたり 3 または 4 匹収容し、餌および水は自由に与えた。

2.2 試薬

L-OHP は和光純薬工業株式会社（大阪）、5%ブドウ糖注射液（5%TZ）は大塚製薬株式会社（徳島）、RG は株式会社ツムラ（東京）のエキス顆粒（医療用）、Isogen は株式会社ニッポンジーン（東京）、グリコーゲン（ムラサキイガイ由来）は富士フイルム和光純薬（大阪）、SYBR Premix Dimer Eraser はタカラバイオ株式会社（滋賀）、Super Script™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR は Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA, USA) から購入した。他の試薬に関しては分析グレードの物を使用した。

2.3 薬物投与

薬剤の調整および薬剤の投与は、L-OHP 誘発性冷感過敏モデルラットを作成した Ushio ら³⁸⁾ および Kato ら²¹⁾ の報告に準じて行った。L-OHP は濃度 4 mg/mL となるよう 5%TZ にて溶解し、腹腔内投与 (i.p.) 用とした。RG は濃度 200 mg/mL となるよう精製水で溶解し、経口投与 (p.o.) 用とした。L-OHP または RG のコントロールとして、それぞれ 5%TZ (i.p.) または精製水 (p.o.)

を投与した。

16 匹のラットを薬物投与開始の 1 週間前に馴化し、A 群 (n=8)、B 群 (n=4)、および対照群 (n=4) の 3 群に分けた。

A 群 (L-OHP 単独投与群、n=8) : L-OHP (i.p.) + 精製水 (p.o.)

B 群 (L-OHP+RG 併用群、n=4) : L-OHP (i.p.) +RG (p.o.)

対照群 (Control 群、n=4) : 5%TZ (i.p.) + 精製水 (p.o.)

対照群に精製水 (5 mL/kg/day) を 1 日 1 回 12 日間経口投与し、5%TZ を 1、2、8、9 日目に腹腔内投与した。A 群に、精製水 (5 mL/kg/day) を 1 日 1 回 12 日間経口投与し、L-OHP (4 mg/kg/day) を 1、2、8、9 日目に腹腔内投与した。試験期間内 12 日間の L-OHP の累積投与量は 16 mg/kg であった。B 群に RG (1 g/kg/day) を 1 日 1 回 12 日間経口投与し、L-OHP (4 mg/kg/day) を 1、2、8、9 日目に腹腔内投与した。試験期間内 12 日間の L-OHP の累積投与量は 16 mg/kg で A 群と同じであった。RG および精製水は午前 9 時から午前 11 時までの間に経口投与し、L-OHP は同日午後 1 時から午後 3 時の間に腹腔内投与した。

2.4 冷感感受性試験

冷感感受性試験は、コールドプレート (MK-350HC、室町機械株式会社、東京) を用いて、冷アロディニアと冷感痛覚過敏を冷感感受性の指標として評価した³⁹⁾。冷アロディニアと冷感痛覚過敏について、通常のラットでは痛みを引き起こさない冷刺激に対し、痛みを感じる症状を冷アロディニアとして、また、通常のラットでも痛みを感じる冷刺激に対し、痛みが増強する症状を

冷感痛覚過敏として定義している⁴⁰⁻⁴²⁾。Ling ら⁴³⁾および Andrew⁴⁴⁾らの報告を参考に、ラットにおける冷アロディニアは 10℃で、冷感痛覚過敏は 4℃のクールドプレートを用いて冷感感受性試験を行った。また、冷アロディニアおよび冷感痛覚過敏を同日もしくは連日で評価することを避けるため、冷アロディニアに対する冷感感受性試験を、薬物投与開始後 3 日目および 10 日目に評価し、冷感痛覚過敏に対する冷感感受性試験を、5 日目および 12 日目に評価した。馴化期間中の 2 日間にそれぞれのベースラインを測定した。ラットは飼育室から室温 25±1℃の試験室に移動し、30 分間の馴化後にクールドプレート上に置き、各温度におけるラットの冷感に対する回避行動を算出した。算出する回避行動は「後脚つま先歩き」、「後脚かかと上げ」および「後脚上げ」とし、カットオフ値は 6 分に設定した（図 2）。なお、冷感感受性試験はビデオカメラの存在下にて行い、試験中 6 分間に起こる冷感に対する回避行動の数を再確認している。全ての冷感感受性試験は群分けに関して盲検的に測定した。

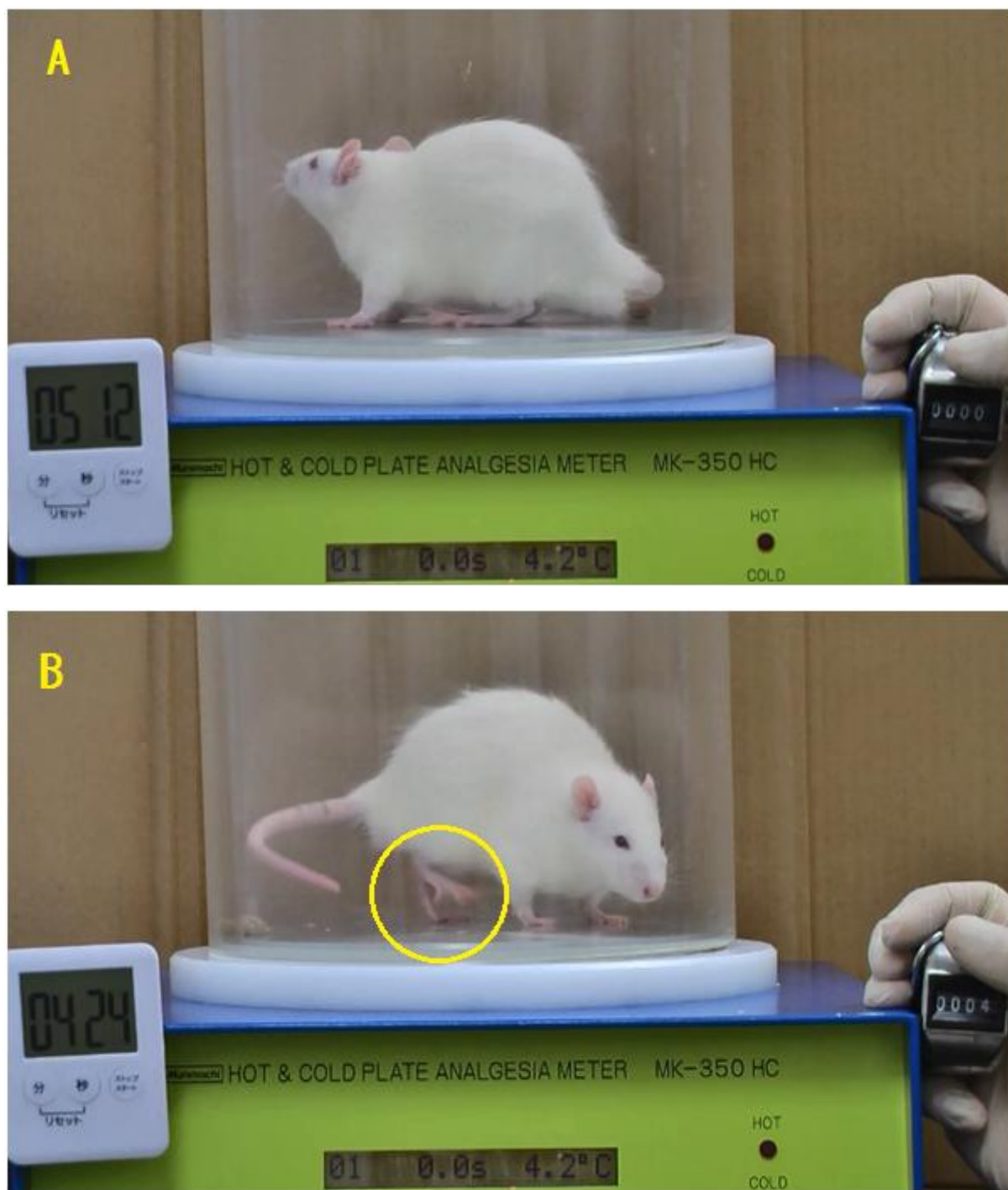


図2 コールドプレートによる冷感感受性試験

コールドプレート (MK-350HC、室町機械株式会社、東京) を用いて、冷アロディニアと冷感痛覚過敏を冷感感受性の指標として評価した²⁴⁾。ラットは飼育室から室温 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の試験室に移動し、30 分間の馴化後にコールドプレート上に置き、 10°C または 4°C のいずれかにおける回避行動を算出した。算出した回避行動は「後脚つま先歩き」、「後脚かかと上げ」および「後脚上げ」とし、カットオフ値は 6 分に設定した。図 2-A は回避行動を行っていないラット、図 2-B は回避行動 (後脚上げ) を行っているラットの様子。

2.5 後根神経節 (Dorsal Root Ganglion : DRG) の採取

薬物投与開始 12 日目の冷感感受性試験終了後に、各群の 4 匹のラットをジエチルエーテル麻醉下にて開腹し、22 G 注射針およびヘパリン処理した注射筒 (10 mL) を用いて、下行大動脈より脱血した。その後、腰椎部を取り出し、氷冷生理食塩液に 2 分程度浸して冷やした。氷冷後、腰椎を腹側と背側から縦に 2 分割し、第 4-6 腰椎 (L4-6) の脊椎後根神経節 (Dorsal Root Ganglion : DRG) を実体顕微鏡下で採取した。なお、採取は氷を敷いたバット上で行い、採取後は-80℃で保存した。

2.6 Total RNA の抽出

採取した DRG に 750 μ L の Isogen を加え、18 G および 20 G の注射針を用いて破碎した。室温にて 5 分間放置後、200 μ L のクロロホルムを加えて 15-20 秒間激しく振盪した。4℃にて 5 分間放置後、15,000 G、4℃にて 15 分間遠心分離を行い、水層を新しいエッペンチューブに移した。得られた水層に 500 μ L の 2-プロパノールおよび沈殿キャリアとして 2 μ L のグリコーゲンを加え、転倒混和後に 4℃で 1 時間放置した。15,000 G、4℃にて 30 分間遠心分離し、上清を取り除いたのち、70%エタノールを加えてさらに 10,000 G、4℃にて 5 分間遠心分離を繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き、沈殿物を室温にて乾燥させた。乾燥した沈殿物に 20 μ L の超純水を加えて溶解したのち、230、260、280 および 320 nm の吸光度を測定し、Total RNA の濃度および精製度を求めた。なお、Total RNA の濃度の算出には以下の式を用いた。

$$\text{Total RNA 濃度 (ng/}\mu\text{L)} = [\text{吸光度 260 nm}] \times 40 \times \text{希釈倍率}$$

2.7 相補 DNA (complementary DNA : cDNA) の合成

cDNA の合成には Super Script™ II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen 社製)を用いた。

DRG より得られた 1 µg の Total RNA に、10 mM dNTPs 1 µg 、0.5 µg/µL Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer 1 µL および超純水を加え、全量を 10 µL とした。これを 65℃にて 5 分間加熱したのち、氷上にて 1 分間以上放置した。この間、2×Reaction Buffer [チューブ 1 本あたり 10×RT Buffer 2 µL、25 mM MgCl₂ 4 µL、0.1 MDTT 2 µL および RNaseOUT (40 U/µL) 1 µL] を調整した。氷冷したサンプルに 2×Reaction Buffer 9 µL を加えて混和したのち、42℃で 2 分間加温した。その後、逆転写酵素 SuperScript II Reverse Transcriptase を 1 µL 加え、42℃にて 50 分間反応させた。その後 70℃で 15 分間加温し、酵素を失活させた。氷冷後、RNase H を 1 µL 加えて 37℃にて 20 分間加温し、RNA を分解することで cDNA のみを調製した。

2.8 qRT-PCR 条件

PCR は SYBR Premix Dimer Eraser を用いて、7300 Real-Time PCR System [Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA, USA)] により行った。

得られた cDNA の 100-200 倍希釈液 (2 µL)、2.5 mM dNTPs、5 pmol forward primer、5 pmol reverse primer および SYBR Premix Dimer Eraser 0.5 unit (全量 20 µL) 共存下、PCR 反応を行った。PCR のオリゴヌクレオチドプライマーの配列は以下の通りである。内在性コントロールは β-アクチンとした。

TRPM8 : 5'-gccagtgatgtggacagta-3' (センス)、5'-ggactcatttcccgagaagg-3' (アンチセンス)

TRPA1 : 5'-atttgcgctgagttttt-3' (センス)、5'-tccatcattgtcctcatcca-3' (アンチセンス)

β -アクチン : 5'-cccgcgagtacaaccttct-3' (センス)、5'-cgtcatccatggcgaact-3' (アンチセンス)

PCR 条件は、95°Cに加熱したヒートブロックにサンプルを置き、95°Cで 30 秒間加熱した。その後、95°Cで 15 秒間、55°Cで 30 秒間および 72°Cで 32 秒間を 45 サイクル繰り返した。解離曲線を観察するために、最終解離サイクル (95°Cで 15 秒、60°Cで 1 分、および 95°Cで 15 秒) を行った。qPCR 産物の相対定量は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて行った⁴⁵⁾。TRPM8 および TRPA1 mRNA の発現の相対変化は、対照遺伝子として β -アクチン mRNA を用いて標準化した。

2.9 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism バージョン 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。データ解析は、L-OHP 誘発性冷感過敏症および痛覚過敏に対する RG の効果について、二元配置反復測定分散分析 (ANOVA) を行い、その後 Bonferroni の多重比較試験を行った。*TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現に対する L-OHP および RG の効果について、二元配置 ANOVA 後の Bonferroni の多重比較試験による統計解析を行った。有意水準を $p < 0.05$ とした。

2.10 倫理的配慮

全ての実験は、国際医療福祉大学動物実験委員会により承認された (承認番号 : 13103)。

第3節 結果

3.1 L-OHP 誘発性冷アロディニアおよび痛覚過敏に対する RG の効果

コールドプレートを用いた冷感感受性試験では 10℃または 4℃でのラットの回避行動をカウントすることにより、L-OHP 誘発性冷アロディニア（図 3）または冷感痛覚過敏（図 4）に対する RG の効果を評価した。

10℃での冷アロディニアにおける回避行動のベースライン測定値は、3 群間で有意差はなかった。薬物投与開始後 3 日目では、L-OHP のみを投与した A 群の回避行動の数は、対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。これに対し、L-OHP と RG の両方を投与した B 群の回避行動の数は、対照群のものと同等であった。薬物投与開始後 10 日目では、L-OHP のみを投与した A 群の回避行動の数は、対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。これに対し、L-OHP と RG の両方を投与した B 群の回避行動の数は、対照群のものと同等であり、L-OHP のみを投与した A 群と比較して有意に低かった ($p < 0.01$)。

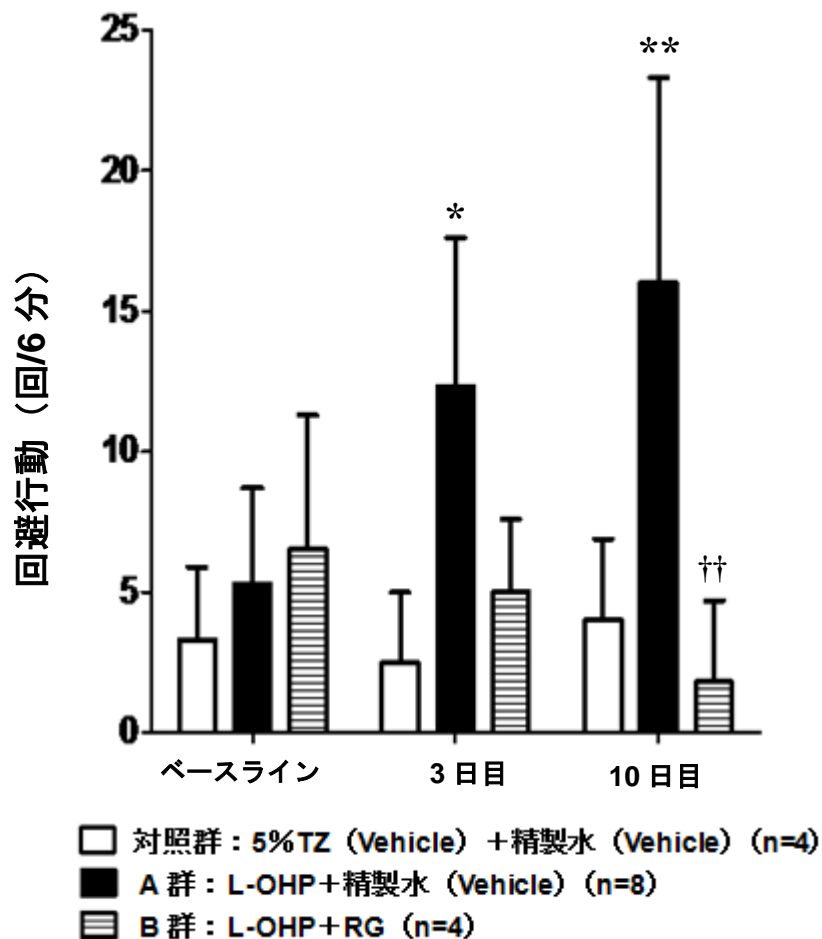


図3 10°Cにおける L-OHP および RG 投与に対する回避行動の変化

群は以下のように処理した。対照群 : L-OHP の溶解液である 5%TZ (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、A 群 : L-OHP (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、B 群 : L-OHP (i.p.) +RG (p.o.)。各群のラットの総数を括弧内に示す。回避行動は、コールドプレートを用いて 10°C における冷アロディニアについて評価した。馴化期間中に測定された回避行動をベースラインとした。縦軸は 6 分間における回避行動 (回)、エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$: A 群 vs 対照群、** $p < 0.01$: A 群 vs 対照群、†† $p < 0.01$: B 群 vs A 群。

4℃での冷感痛覚過敏における回避行動のベースライン測定値は、3 群間で有意差はなかった (図 4)。薬物投与開始後 5 日目では、L-OHP のみを投与した A 群の回避行動の数は、対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。これに対し、L-OHP と RG の両方を投与した B 群の回避行動の数は、対照群のものと同等であり、L-OHP のみを投与した A 群と比較して有意に低かった ($p < 0.01$)。薬物投与開始後 12 日目では、L-OHP のみを投与した A 群の回避行動の数は、対照群と比較して有意に高かった ($p < 0.01$)。これに対し、L-OHP と RG の両方を投与した B 群の回避行動の数は、対照群のものと同等であり、L-OHP のみを投与した A 群と比較して有意に低かった ($p < 0.01$)。

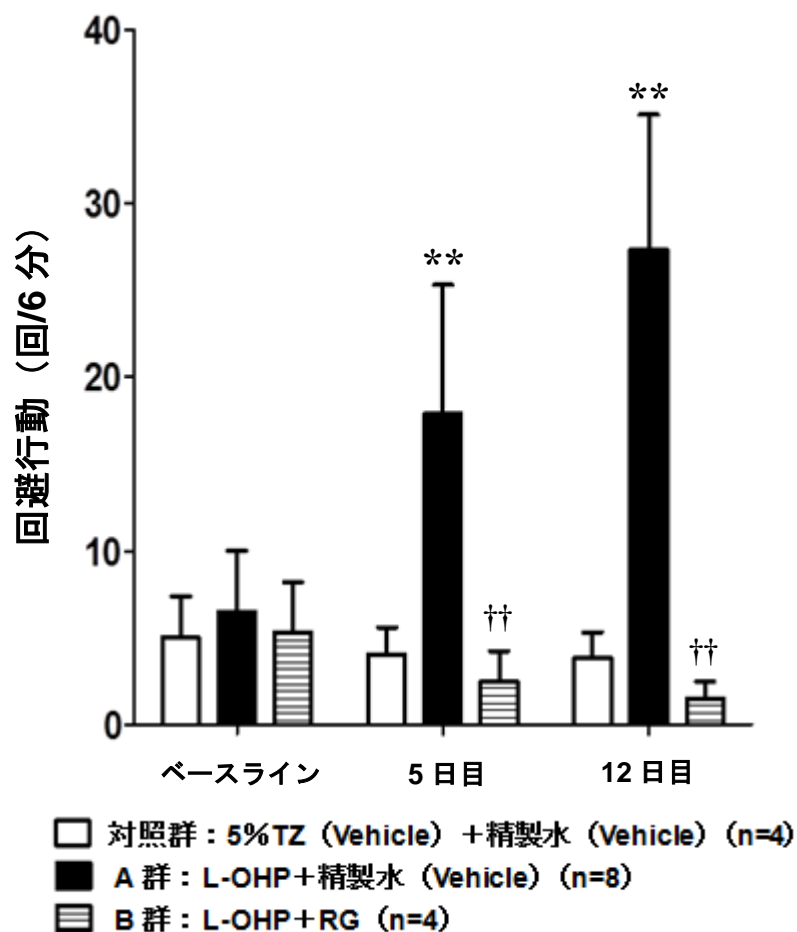


図4 4℃における L-OHP および RG 投与に対する回避行動の変化

群は以下のように処理した。対照群 : L-OHP の溶解液である 5%TZ (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、A 群 : L-OHP (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、B 群 : L-OHP (i.p.) +RG (p.o.)。各群のラットの総数を括弧内に示す。回避行動は、コールドプレートを用いて 10℃における冷アロディニアについて評価した。馴化期間中に測定された回避行動をベースラインとした。縦軸は 6 分間における回避行動 (回)、エラーバーは標準偏差を示す。

** $p < 0.01$: A 群 vs 対照群、†† $p < 0.01$: B 群 vs A 群。

3.2 TRPM8 および TRPA1 mRNA の発現に対する L-OHP および RG の影響

qRT-PCR 法を用いて L4-6 DRG 中の *TRPM8 mRNA* (図 5) および *TRPA1 mRNA* (図 6) の発現レベルを解析した。

L-OHP のみを投与した A 群の *TRPM8 mRNA* 発現レベルは対照群の *TRPM8 mRNA* 発現レベルよりも有意に亢進した (図 5、 $p < 0.05$)。これに対し、L-OHP および RG を投与した B 群の *TRPM8 mRNA* 発現レベルは A 群と比較して有意に抑制された ($p < 0.05$)。また、B 群の *TRPM8 mRNA* 発現レベルは対照群と同等であった。

L-OHP のみを投与した A 群の *TRPA1 mRNA* 発現レベルは対照群の *TRPA1 mRNA* 発現レベルよりも有意に亢進した (図 6、 $p < 0.01$)。これに対し、L-OHP および RG を投与した B 群の *TRPA1 mRNA* 発現レベルは A 群と比較して有意に抑制された ($p < 0.05$)。また、B 群の *TRPA1 mRNA* 発現レベルは対照群と同等であった。

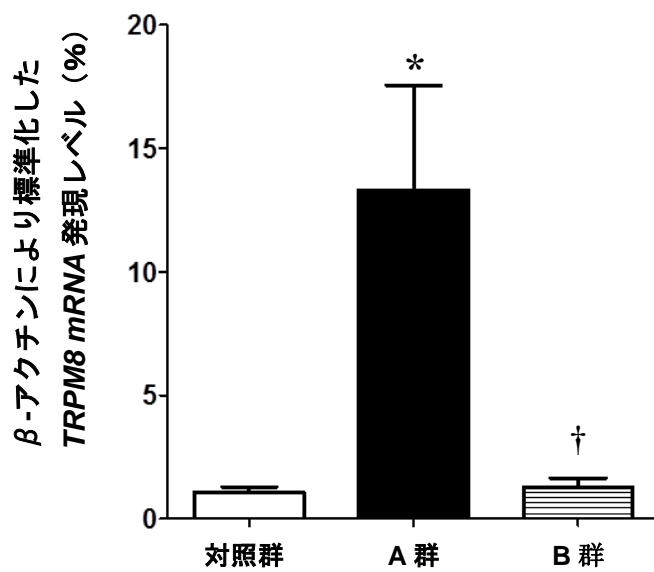


図 5 L-OHP および RG を投与したラットの *TRPM8 mRNA* 発現レベル

群は以下のように処理した。対照群：L-OHP の溶解液である 5%TZ (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、A 群：L-OHP (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、B 群：L-OHP (i.p.) +RG (p.o.)。縦軸は β -アクチンで標準化した *TRPM8 mRNA* 発現レベル (%) を示す。

* $p < 0.05$: A 群 vs 対照群、† $p < 0.05$: B 群 vs A 群。

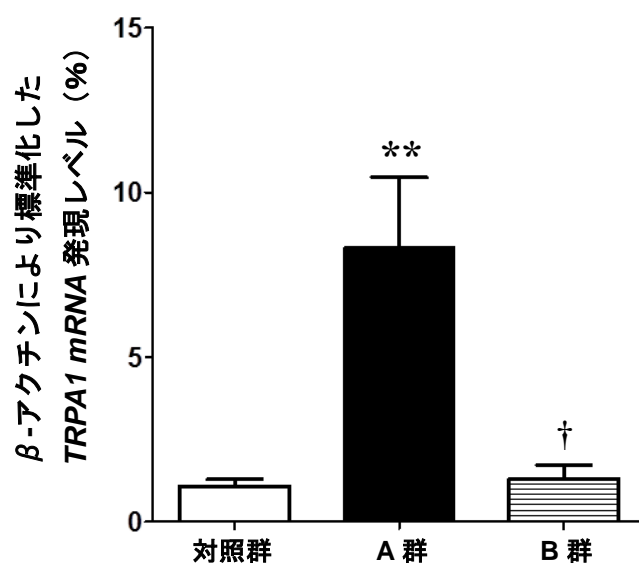


図6 L-OHP および RG を投与したラットの *TRPA1 mRNA* 発現レベル

群は以下のように処理した。対照群：L-OHP の溶解液である 5%TZ (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、A 群：L-OHP (i.p.) +RG の溶解液である精製水 (p.o.)、B 群：L-OHP (i.p.) +RG (p.o.)。縦軸は β -アクトニンで標準化した *TRPA1 mRNA* 発現レベル (%) を示す。

** $p < 0.01$: A 群 vs 対照群、† $p < 0.05$: B 群 vs A 群。

第4節 考察

TRP スーパーファミリーである TRPM8 および TRPA1 は温度によって活性化されるイオンチャネルである²⁶⁾。また、TRPM8 はメントール、TRPA1 はマスタード油等の化学物質によっても活性化され²⁶⁾、*TRPM8* および *TRPA1 mRNA* は、L-OHP 誘発性冷感過敏モデルラットにおいて発現が上昇することが知られている²⁷⁾。Kato らは、ラットにおいて L-OHP 投与により *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* が過剰に発現し、GJG 投与によってこれらの mRNA の発現が抑制されていることを報告している²⁹⁾。これらの報告から、L-OHP 誘発性冷感過敏に *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* が関与し、GJG の併用により *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現が抑制されることで、L-OHP 誘発性冷感過敏が改善すると考えられる。

コールドプレートを用いた冷感感受性試験では、10℃における冷アロディニアおよび4℃における冷感痛覚過敏について評価し、L-OHP のみを投与した群では、10℃および4℃における回避行動の数は増加した。このことから、L-OHP 投与によって冷アロディニアおよび冷感痛覚過敏を発症し、Kato からの報告²⁹⁾と同様に L-OHP 誘発性冷感過敏の状態であることが示された。一方、L-OHP 投与に加えて RG を併用した群では、10℃および4℃における回避行動の数は L-OHP 単独投与群と比較して有意に減少した。これらのことから、RG の併用は L-OHP 誘発性冷感過敏症状を抑制することが示唆された。

次に、qRT-PCR を用いて *TRPM8 mRNA* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルを調べた結果、L-OHP 投与により亢進した *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルが、RG 併用により有意に抑制された。このことから、RG は L-OHP 投与により過剰発現した *TRPM8* および *TRPA1*

mRNA を抑制することで、L-OHP 誘発性冷感過敏に対し効果を示す可能性が考えられる。

RG は GJG の構成生薬のうち 4 種を除いた 6 種の生薬で構成される GJG 関連漢方薬である。

ラットにおいて RG は Ca^{2+} チャネル阻害作用を有し³⁷⁾、また、L-OHP 投与により亢進した *TRPM8 mRNA* の発現が Ca^{2+} チャネル阻害薬により抑制されることが報告されている²⁵⁾。これらの報告から、RG の Ca^{2+} チャネル阻害作用が、本研究における RG の *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現抑制による L-OHP 誘発性冷感過敏に対する効果と関連している可能性が考えられた。

本研究により冷感感受性および L-OHP 誘発性冷感過敏に対する効果について、GJG から 4 種の生薬成分を除いた RG においても Kato らによる GJG についての報告²⁹⁾と同様の効果が示された。従って、GJG 構成生薬のうち L-OHP 誘発性冷感過敏に対して効果を示すのは、GJG から 4 種の生薬を除いた RG の構成生薬成分である地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮の 6 種の生薬成分のいずれかあるいは組み合わせであると考えられる。急性および慢性 PN への GJG の作用メカニズムについては、一酸化窒素の産生増加による血行改善効果⁴⁶⁻⁴⁷⁾やダイノルフィン遊離促進によるオピオイド κ 受容体を介した感覚中枢への作用⁴⁸⁾がマウスおよびラットにおいて報告されており、RG においてもこれらの作用について今後検討を行っていく必要があると考えられる。本研究は RG が L-OHP 投与により過剰発現した *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* を抑制することで、L-OHP 誘発性冷感過敏に対し有効であることを示した最初の知見である。

Kato らの研究では、GJG のみを投与した群における 10℃または 4℃に対する回避行動の数、*TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルは、対照群と同等であったと報告している²⁹⁾。この

結果から、GJG と共通の成分を有する RG の単独投与においても、同様に 10℃または 4℃に対する回避行動の数、*TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルに影響しないと考えられる。

本研究では、GJG の構成生薬のうち L-OHP 誘発性冷感過敏に有効な GJG の生薬成分の絞り込みに成功したが、RG においても、構成生薬成分のうち 1 つまたは複数の成分によって効果が示されるのかは不明である。そのため、L-OHP 誘発性冷感過敏に対する感受性、または *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルに対する RG の各成分の効果を分析するためにさらなる研究が必要である。また、今後臨床における RG の L-OHP 誘発性急性 PN への効果についても検討していく必要があると考えられる。ただし、今回の漢方の投与量はいずれもラット体重あたり 1 g/kg である。ヒト成人に対しての投与量は 1 日量 7.5 g（実験に使用しているツムラ社製の場合）であり、臨床での適応量よりもはるかに多い。今後はラットにおいて L-OHP 誘発性冷感過敏への効果を示す RG の投与量についても検討を行い、臨床に適応可能な投与量について調査する必要があると考えられる。

本研究の限界として、コールドプレートを用いた冷感感受性試験において、回避行動の数を手でカウントしたため、測定が不正確であった可能性がある。従って、自動カウンターを使用して回避行動を評価する方がより正確であると考ええる。また、本研究において L-OHP 投与により過剰発現した *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現が RG により抑制したことを示したが、今後さらに *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現レベルと *TRPM8* および *TRPA1* 受容体の発現レベルについて検討する必要があると考えられる。

研究 2「オキサリプラチンによる急性末梢神経障害の影響因子の解析」

第1節 背景・目的

L-OHP 誘発性 PN は、その発症機序および発症期間により、慢性または急性に分けられる⁴⁾。L-OHP 誘発性慢性 PN は、投与された L-OHP が生体内で分解されて生じた白金が感覚神経細胞の核内に蓄積し、DNA との結合による細胞死を引き起こす事により発症するとの仮説が提唱されている⁷⁾。慢性 PN は L-OHP の累積投与量に依存して出現し、14 日以上続く感覚性の機能障害が生じる⁶⁾。体表面積 (BSA) あたりの累積投与量が 850 mg/BSA を超えると 10%の患者で、1,020 mg/BSA を超えると 20%の患者で慢性 PN が出現するとの報告もある⁸⁾。このことから、慢性 PN は L-OHP を含むレジメンを継続した際に出現すると考えられる。慢性 PN 発症には累積投与量という影響因子が明らかとなっていることから、臨床においては慢性 PN のグレードに応じて L-OHP の減量あるいは休止といった対策が確立されている。

一方、L-OHP 誘発性急性 PN はオキサリプラチン投与患者のほぼ全例に発症し、数時間から 14 日以内に消失する可逆的变化であり、冷たいものや空気に触れることにより誘発される冷感過敏症状が特徴である^{5,6)}。多くの症例において 14 日以内に回復するため、化学療法の中止に至る重篤な例は少ないものの、冷感知覚過敏によって患者の QOL を著しく低下させる。

L-OHP 誘発性急性 PN の発症機序として有力なのは知覚神経細胞膜のイオンチャネル異常である^{49,50)}。Kawashiri らはラットにおいて、L-OHP および Ca^{2+} チャネル阻害薬を投与し、DRG 細胞内の Ca^{2+} 濃度、活性化 T 細胞核内因子 (nuclear factor of activated T-cell : NFAT) の核内移行および *TRPM8 mRNA* の発現について検討した²⁵⁾。その結果、以下の仮説を提唱している。

すなわち L-OHP は体内でシュウ酸とジクロロ 1,2-ジアミノシクロヘキサン白金に代謝され、シュウ酸が Na⁺チャネルに作用し、膜電位の脱分極により Ca²⁺チャネルが開く。これにより活性化 T 細胞核内因子 (nuclear factor of activated T-cell : NFAT) が核内へ移行し、冷感センサーである TRPM8 の合成が促進されるために急性 PN が発症する。このように、急性 PN の発症機序についての報告はあるものの、急性 PN の発症に対する影響因子については未だ明らかではなく、臨床における急性 PN に対する対策についても未だ確立されていない。

L-OHP を含む化学療法において、冷感知覚過敏や咽頭喉頭周囲の感覚異常などの急性 PN の発症した回数が多い患者において、重度の慢性 PN の発症率が高いとの報告もある^{9,10)}。そのため、急性 PN 症状の把握が、慢性 PN 発症や重症化の推定へとつながり、当該患者の慢性 PN 発症リスク軽減に向けた Stop and Go 戦略⁵¹⁾などを計画することも可能視される。以上のことより、L-OHP を含む化学療法施行患者の QOL 向上とともに、治療中断へとつながる慢性 PN の発症を抑制するためにも、急性 PN 発症の要因を解明し、その予防や対策を見出すことが重要と考えられる。

L-OHP 誘発性急性 PN に対する対策として、GJG 併用療法¹³⁾ やカルシウムおよびマグネシウム塩 (CaMg) 併用療法¹⁴⁻¹⁶⁾などの報告がある。CaMg 併用療法では、急性 PN 発症の要因の一つとされるシュウ酸のキレート剤としての効果を想定して CaMg を併用する。しかしながら、CaMg 併用療法による急性および慢性 PN の予防効果について検討した臨床試験である N08CB 試験では、急性または慢性 PN に対する予防効果は得られなかった⁵²⁾。L-OHP を含む化学療法に伴う PN に対して確実に有効とされている治療法は、現在でも確立されていない。なお、2014

年の米国臨床腫瘍学会（American Society of Clinical Oncology : ASCO）ガイドラインにおいて L-OHP やパクリタキセルなどの抗がん剤による副作用としての神経障害に対する予防・治療薬に関しては、デュロキシセチンに中等度のエビデンスがあると推奨しているが¹⁷⁾、めまい、悪心、眠気、不眠、および排尿困難を含む副作用によりデュロキシセチンを中止する例も報告されており¹⁸⁾、明らかな有用性は示されていない。また日本において神経障害性疼痛の治療薬として保険適応があるのはプレガバリンおよびアミトリプチリンのみであり、L-OHP 誘発性 PN に対して著効する治療薬はない。

臨床において急性および慢性 PN に対する GJG 併用療法の予防効果について検討した GENIUS 試験では、急性および慢性 PN に対する GJG の効果を確認することができなかった²⁴⁾。一方、Fukazawa らは、急性および慢性 PN に対し、GJG の予防効果があることを報告している²³⁾。いずれの報告においても、L-OHP 誘発性 PN のうち急性 PN と慢性 PN を区別して GJG の効果を検討しておらず、GJG が急性または慢性 PN のどちらに有効性を示すのかについては未だ明らかとなっていない。

そこで本研究では、L-OHP を含む化学療法施行患者の急性 PN 発症状況について調査を行い、L-OHP 誘発性急性 PN の発症に関する影響因子および急性 PN に対する GJG の効果について解析を行った。

第2節 方法

2.1 対象患者

2010 年 1 月～2017 年 8 月に国際医療福祉大学三田病院において、L-OHP を含む化学療法として FOLFOX4/6 療法、FOLFIRINOX 療法、SOX 療法、および CapeOX 療法を施行した患者を対象とした。なお、L-OHP の標準投与量 130 mg/BSA（投与間隔：3 週間）である SOX 療法および CapeOX 療法を高用量群、L-OHP の標準投与量 85 mg/BSA（投与間隔：2 週間）である FOLFOX 療法および FOLFIRINOX 療法を低用量群とした（表 1）。全てのレジメンにおいて L-OHP の投与時間は 2 時間であった。

また、事前に L-OHP による治療以外の原因により既に PN が発症している例や、投与後のフォローアップが不可能な例は除外した。さらに、糖尿病による糖尿病性神経障害や腰部脊柱管狭窄症による慢性疼痛が今回の L-OHP 誘発性 PN の調査へ影響することを考慮し、該当する既往を有する患者の中で、既往症による PN と判断した例は除外とした。

表 1 L-OHP を含む調査対象レジメンの詳細

レジメン名	高用量群		低用量群	
	SOX	CapeOX	FOLFOX4/6	FOLFIRINOX
L-OHP (mg/BSA)	130	130	85	85
TS-1 (mg/day)	BSA < 1.25 m ² : 80			
	1.25 m ² ≤ BSA < 1.5 m ² : 100	-	-	-
	1.5 m ² ≤ BSA : 120			
CAP (mg/BSA)	-	2000	-	-
急速 5-FU (mg/BSA)	-	-	400	400
22 時間持続 5-FU (mg/BSA)	-	-	600/-	-
46 時間持続 5-FU (mg/BSA)	-	-	-/2400	2400
I-LV (mg/BSA)	-	-	10/200	200
CPT-11 (mg/BSA)	-	-	-	180
投与時間	2 時間	2 時間	2 時間	2 時間
投与間隔	3 週毎	3 週毎	2 週毎	2 週毎

カペシタビン (capecitabine : CAP)、フルオロウラシル (5-fluorouracil : 5-FU)、レボホリナート (levofolinate : I-LV)、イリノテカン (irinotecan : CPT-11)

2.2 調査項目

調査対象項目は、性別、年齢、体重、身長、肥満指数 (body mass index : BMI)、がん原発部位、L-OHP の初回投与量、肝機能としてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate amino transferase : AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine amino transferase : ALT)、腎機能としてクレアチニンクリアランス (creatinine clearance : Ccr)、血清クレアチニン (serum creatinine : Scr)、PN の予防または治療薬として汎用される GJG、プレガバリン、デュロキセチン、メコバロミンについての併用の有無、使用レジメン、急性 PN 発症コース数について、電子カルテからレトロスペクティブに調査した。Ccr は Cockcroft & Gault 式を用いて算出した。これらの調査項目は L-OHP の投与開始時または投与開始日直近のデータを対象に抽出した。

L-OHP 投与直後から次回投与前までの間に初めて発症した PN のみを急性 PN と定義した。急性 PN 発症の判定は、医師、薬剤師、看護師による冷感過敏症状あるいはしびれの発症に関してカルテ記載されていたものを急性 PN 発症例とした。また、初回急性 PN 発症直前の L-OHP 投与コース数を急性 PN 発症コース数と定義し、1 コース目に急性 PN を発症した患者を 1 コース発症群、1 コース目に PN を発症しなかった患者は全て 1 コース非発症群とした。

2.3 統計解析

各調査項目の代表値は中央値（四分位範囲）で示す。

2 群間の比較には連続変数に対して Mann-Whitey U-test、カテゴリー変数に対して Fisher's

exact test を行った。さらに、1 コース目の急性 PN 発症の有無を従属変数として多重ロジスティック回帰分析を行った。また、高用量群と低用量群における急性 PN 発症時期の比較は Kaplan-Meier 法 (Log Rank 検定) により行った。

有意水準は 5% とし、すべての統計解析には SPSS (IBM SPSS Statistics 25 : 日本アイ・ビー・エム (株)、東京) を使用した。

2.4 倫理的配慮

本研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づき国際医療福祉大学大学院倫理委員会の承認 (承認番号: 15-Ig-50) および同大学三田病院倫理委員会の承認 (承認番号: 5-15-37) を得て行った。

第3節 結果

3.1 患者背景および急性 PN の発症時期

調査期間中（2010 年 1 月～2017 年 8 月）の対象患者 93 例のうち、除外項目に該当する症例を除いた解析対象患者の総数は 71 例であった（表 2）。性別は男性 37 例、女性 34 例、年齢の中央値は 63 歳（四分位範囲：55.0-70.0）、身長 of 中央値は 1.62 m（四分位範囲：1.54-1.70）、体重の中央値は 55.0 kg（四分位範囲：47.7-60.5）、BMI の中央値は 20.8 kg/m²（四分位範囲：19.1-23.8）、AST の中央値は 22.0 U/L（四分位範囲：18.0-28.0）、ALT の中央値は 20.0 U/L（四分位範囲：13.0-32.0）、Ccr の中央値は 84.4 mL/min（四分位範囲：70.0-102.8）、Scr の中央値は 0.68 mg/dL（四分位範囲：0.55-0.80）、初回投与量の中央値は 85.0 mg/BSA（四分位範囲：81.7-124.9）、GJG 併用患者は 22 例、GJG 非併用患者は 49 例であった。また、原発部位は胃 4 例、小腸 1 例、大腸 54 例、膵臓 12 例であった。各レジメンの施行患者数は、SOX 療法 19 例、CapeOX 療法 9 例、FOLFOX 療法 31 例、FOLFIRINOX 療法 12 例であった。従って、高用量群（130 mg/BSA）は 28 例、低用量群（85 mg/BSA）は 43 例であった（表 2）。なお、患者の状態により初回投与量が調節されていたが、高用量群の L-OHP の最低投与量は 99.4 mg/BSA、低用量群の最高投与量は 87.8 mg/BSA であり、両群間で投与量の重複はなかった。

なお、対象患者のうち、L-OHP の初回投与時からプレガバリン、デュロキセチンおよびメコバロミンを併用している患者はいなかった。

表 2 患者背景

	総数
症例（例数）	71
年齢（歳）	63.0（55.0-70.0）
男性/女性（例）	37/34
身長（m）	1.62（1.54-1.70）
体重（kg）	55.0（47.7-60.5）
BMI（kg/m ² ）	20.8（19.1-23.8）
AST（U/L）	22.0（18.0-28.0）
ALT（U/L）	20.0（13.0-32.0）
Ccr（mL/min）	84.4（70.0-102.8）
Scr（mg/dL）	0.68（0.55-0.80）
初回投与量（mg/BSA）	85.0（81.7-124.9）
GJG 併用 有/無（例）	22/49
胃	4
原発部位 小腸	1
（例数） 大腸	54
膵臓	12
高用量群	28
SOX（例）	19
CapeOX（例）	9
低用量群	43
FOLFOX（例）	31
FOLFIRINOX（例）	12

質的変数は例数、連続変数は中央値（四分位範囲）で表記。

3.2 単変量解析による各調査項目の比較

各調査項目について1コース発症群と1コース非発症群を単変量解析によって比較した(表3)。

1コース発症群は37例、1コース非発症群は34例であり全症例の52%が1コース目で急性PNを発症していた。年齢は1コース発症群で63.0歳(四分位範囲:50.0-68.0)、1コース非発症群で65.0歳(四分位範囲:57.0-71.0)、性別は1コース発症群で男性19例に対し女性18例、1コース非発症群で男性18例に対し女性16例、身長は1コース発症群で1.61 m(四分位範囲:1.54-1.72)、1コース非発症群で1.63 m(四分位範囲:1.55-1.68)、体重は1コース発症群で57.0 kg(四分位範囲:49.0-62.5)、1コース非発症群で53.5 kg(四分位範囲:46.2-60.2)、BMIは1コース発症群で21.0 kg/m²(四分位範囲:19.4-24.4)、1コース非発症群で20.1 kg/m²(四分位範囲:19.1-22.3)、ASTは1コース発症群で21.0 U/L(四分位範囲:17.0-29.5)、1コース非発症群で22.5 U/L(四分位範囲:18.8-28.3)、ALTは1コース発症群で21.0 U/L(四分位範囲:14.5-32.0)、1コース非発症群で18.5 U/L(四分位範囲:12.0-29.8)、Ccrは1コース発症群で88.3 mL/min(四分位範囲:76.9-113.1)、1コース非発症群で81.5 mL/min(四分位範囲:65.8-90.4)、Scrは1コース発症群で0.66 mg/dL(四分位範囲:0.53-0.81)、1コース非発症群で0.68 mg/dL(四分位範囲:0.57-0.79)であり、いずれも両群間に差はなかった。

初回投与量は、1コース発症群で117.3 mg/BSA(四分位範囲:84.7-127.4)、1コース非発症群で83.5 mg/BSA(四分位範囲:80.6-85.0)であり、1コース発症群が有意に高値を示した($p < 0.001$)。

また、1コース発症群における高用量群患者の割合は37例中23例(62.2%)、1コース非発症

群においては 34 例中 5 例 (14.7%) であり、1 コース発症群では高用量群患者の割合が 1 コース非発症群と比較して有意に多かった ($p < 0.001$)。

1 コース発症群の原発部位は胃 3 例、小腸 1 例、大腸 31 例、膵臓 2 例であった。一方、1 コース非発症群の原発部位は胃 1 例、小腸 0 例、大腸 23 例、膵臓 10 例であった。

表 3 1 コース発症群と非発症群における背景比較

	1 コース発症群	1 コース非発症群	<i>p</i> 値 ^{a)}
症例 (例)	37	34	-
年齢 (歳)	63.0 (50.0-68.0)	65.0 (57.0-71.0)	0.165 ^{a)}
男性/女性 (例)	19/18	18/16	0.894 ^{b)}
身長 (m)	1.61 (1.54-1.72)	1.63 (1.55-1.68)	0.936 ^{a)}
体重 (kg)	57.0 (49.0-62.5)	53.5 (46.2-60.2)	0.298 ^{a)}
BMI (kg/m ²)	21.0 (19.4-24.4)	20.1 (19.1-22.3)	0.222 ^{a)}
AST (U/L)	21.0 (17.0-29.5)	22.5 (18.8-28.3)	0.620 ^{a)}
ALT (U/L)	21.0 (14.5-32.0)	18.5 (12.0-29.8)	0.294 ^{a)}
Ccr (mL/min)	88.3 (76.9-113.1)	81.5 (65.8-90.4)	0.066 ^{a)}
Scr (mg/dL)	0.66 (0.53-0.81)	0.68 (0.57-0.79)	0.683 ^{a)}
初回投与量 (mg/BSA)	117.3 (84.7-127.4)	83.5 (80.6-85.0)	< 0.001 ^{a)}
高用量群/低用量群 (例)	23/14	5/29	< 0.001 ^{b)}
胃	3	1	-
原発部位 小腸	1	0	-
(例) 大腸	31	23	-
膵臓	2	10	-

質的変数は例数、連続変数は中央値（四分位範囲）で表記。

^{a)} Mann-Whitey *U*-test, ^{b)} Fisher's exact test.

3.3 多重ロジスティック回帰分析による急性 PN 発症の要因分析

1 コース目での急性 PN の有無について、年齢、BMI、ALT、Ccr および初回投与量の 5 項目における多重ロジスティック回帰分析を行った（表 4）。

独立変数は、単変量解析（表 3）による p 値のカットオフ値を 0.3 とし、相関すると考えられる項目についてはそのうちの 1 項目を選択した。すなわち体格については身長、体重、BMI のうち BMI を、肝機能については AST、ALT のうち ALT を、腎機能については Ccr、Scr のうち Ccr を選択した。従って、独立変数は年齢、BMI、ALT、Ccr および初回投与量の 5 項目とした。

1 コース発症群と 1 コース非発症群との比較において、年齢はオッズ比 0.988、信頼区間 0.913-1.068、BMI はオッズ比 1.053、信頼区間は 0.866-1.279、ALT はオッズ比 1.017、信頼区間 0.986-1.049、Ccr はオッズ比 1.004、信頼区間 0.975-1.034 であり、いずれも両群間に有意な差はなかった。

一方、初回投与量はオッズ比 1.051、信頼区間 1.023-1.079 であり、1 コース発症群では 1 コース非発症群と比較して有意に多かった ($p < 0.001$)。

表 4 多重ロジスティック回帰分析による 1 コース PN 発症に影響する因子探索

影響因子	1 コース発症群	1 コース非発症群	オッズ比	95%信頼区間	<i>p</i> 値
年齢（歳）	63.0（50.0-68.0）	65.0（57.0-71.0）	0.988	0.913-1.068	0.758
BMI（kg/m ² ）	21.0（19.4-24.4）	20.1（19.1-22.3）	1.053	0.866-1.279	0.605
ALT（U/L）	21.0（14.5-32.0）	18.5（12.0-29.8）	1.017	0.986-1.049	0.291
Ccr（mL/min）	88.3（76.9-113.1）	81.5（65.8-90.4）	1.004	0.975-1.034	0.775
初回投与量（mg/BSA）	117.3（84.7-127.4）	83.5（80.6-85.0）	1.051	1.023-1.079	< 0.001

連続変数は中央値（四分位範囲）で表記。

3.4 低用量群と高用量群の急性 PN 発症コース数の比較

Kaplan-Meier 法による高用量群と低用量群の投与コース数における PN 累積発症率の変化を示す（図 7）。50%発症コース数は高用量群で 1 コース、低用量群で 2 コースであり、80%発症コース数は高用量群で 1 コース、低用量群で 3 コースであり、90%発症コース数は高用量群で 2 コース、低用量群で 6 コースであった。この様に、高用量群は低用量群と比較して投与コース数が少ない時点で PN を発症しており、Log Rank 検定により有意差が認められた（ $p < 0.001$ ）。

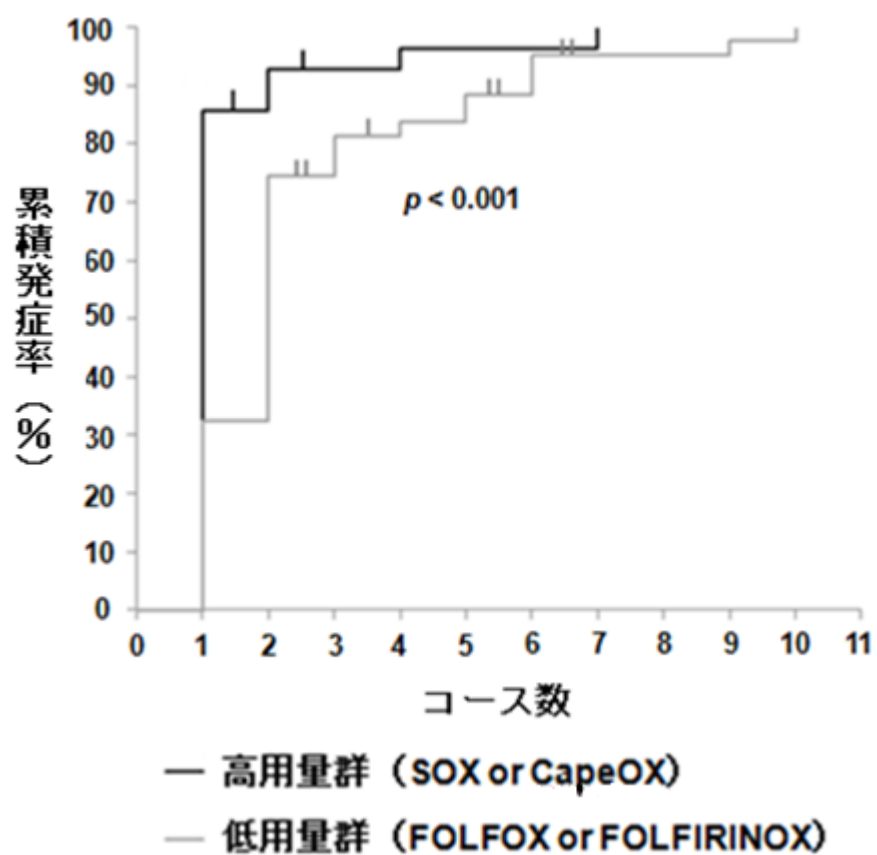


図 7 高用量群と低用量群の投与コース数における PN 累積発症率の変化
 縦軸は L-OHP 誘発性急性 PN の累積発症率、横軸はコース数を示す。高用量群と低用量群の投与コース数における累積発症率について Log Rank 検定により比較した。

3.5 1 コース発症群と非発症群における GJG 併用の影響

1 コース発症群と 1 コース非発症群において、GJG を併用している患者の割合について Fisher's exact test により解析した（表 5-7）。

全症例において、1 コース PN 発症の割合は、GJG 併用患者では 22 例中 12（54.5%）、GJG 非併用患者では 49 例中 25 例（51.0%）であり、ほぼ同率であった。

また、低用量群（FOLFOX または FOLFIRINOX）における 1 コース PN 発症の割合は、GJG 併用患者では 13 例中 6 例（46.2%）、GJG 非併用患者では 30 例中 8 例（26.7%）であり、GJG 併用患者の方が急性 PN 発症の割合が高い傾向がみられた。

一方、高用量群（SOX または CapeOX）における 1 コース PN 発症の割合は、GJG 併用患者では 9 例中 6 例（66.7%）、GJG 非併用患者では 19 例中 17 例（89.5%）であり、GJG 併用患者の方が急性 PN 発症の割合が低い傾向がみられた。

表 5 全症例における 1 コース発症群と非発症群における GJG 併用の影響

全症例数 (n=71)	1 コース発症群	1 コース非発症群	<i>p</i> 値 ^{b)}
GJG 併用有 (n=22) 例 (%)	12 (54.5)	10 (45.5)	0.803
GJG 併用無 (n=49) 例 (%)	25 (51.0)	24 (49.0)	

質的変数は例数、括弧内は各 GJG 群の n 数を分母とした割合 (%) で表記。

^{b)} Fisher's exact test.

表 6 低用量群における 1 コース発症群と非発症群における GJG 併用の影響

低用量群 (n=43)	1 コース発症群	1 コース非発症群	<i>p</i> 値 ^{b)}
GJG 併用有 (n=13) 例 (%)	6 (46.2)	7 (53.8)	0.292
GJG 併用無 (n=30) 例 (%)	8 (26.7)	22 (73.3)	

質的変数は例数、括弧内は各 GJG 群の n 数を分母とした割合 (%) で表記。

^{b)} Fisher's exact test.

表 7 高用量群における 1 コース発症群と非発症群における GJG 併用の影響

高用量群 (n=28)	1 コース発症群	1 コース非発症群	<i>p</i> 値 ^{b)}
GJG 併用有 (n=9) 例 (%)	6 (66.7)	3 (33.3)	0.290
GJG 併用無 (n=19) 例 (%)	17 (89.5)	2 (10.5)	

質的変数は例数、括弧内は各 GJG 群の n 数を分母とした割合 (%) で表記。

^{b)} Fisher's exact test.

第4節 考察

L-OHPを含む化学療法を受けた患者におけるL-OHP誘発性急性PN発症の影響因子について解析した結果、L-OHP誘発性急性PN発症の影響因子は初回投与量であることが示された。さらに、1コース発症群では1コース非発症群よりも高用量のL-OHPを投与された患者の割合が有意に多かったことから、SOXまたはCapeOXのようなL-OHPの初回投与量が高用量となるレジメンでは、早期にL-OHP誘発性急性PNを発症することが示された。

一方、年齢、性別、身長、体重、BMI、肝機能（AST、ALT）および腎機能（Scr、Ccr）については、L-OHP誘発性急性PN発症との関連は認められなかった。今井らはFOLFOX4療法を7コース以上施行した患者45名を急性または慢性のPN発症群30名、PN未発症群15名に分けた因子解析の結果、性別、年齢、BMI、AST、Ccrは急性または慢性PN発症への関与は認められなかったと報告している⁵³⁾。今回の研究では急性PNのみを対象としているため、一概に比較はできないものの、年齢、性別、体格、肝機能および腎機能の因子が急性PNの発症に関与する可能性は低いと考えられる。

また、多重ロジスティック回帰分析においても初回投与量が1コース目での急性PN発症における有意な要因となり（表4）、さらに、Kaplan-Meier分析より高用量群は低用量群よりも有意に投与回数が少ない段階で急性PNが発症することが示された。以上の結果より、L-OHPの初回投与量は急性PN発症における極めて重要な要因であり、初回投与量が高用量となるレジメンを用いる場合は、急性PNの発症リスクにより注意する必要がある。慢性PNの発症に関しては累積投与量が重要関連因子であるとの報告があるが⁸⁾、急性PNにおいては影響因子についての

報告はなかった。今回の研究は、急性 PN のみを対象としてその影響因子が初回投与量であることを示した初の知見である。この結果から、L-OHP の投与量が高用量となるレジメンの初回投与前には、患者へ急性 PN やその発症について説明し、冷感刺激を避けるなどの対処方法を十分に指導することが重要であると考えられる。

Argyriou らは CapeOX 群（高用量群）と FOLFOX 群（低用量群）で急性 PN の発症率や重症度に差はなく、慢性 PN では低用量群の方が発症率や重症度ともに有意に増悪すると報告している⁵⁴⁾。一方、Storey らは CapeOX 群（高用量群）と FOLFOX 群（低用量群）において急性 PN の発症率や重症度に差はないが、慢性 PN では CapeOX 群（高用量群）の方が発症率や重症度ともに有意に増悪すると報告している⁵⁵⁾。なお、いずれの報告も急性 PN の発症率は高用量群と低用量群の複数回投与後に検討しているが、本研究では、1 コース目、あるいは投与コース毎に急性 PN の発症を検討しており、評価のタイミングが異なっている。本研究の新規性は高用量群では低用量群よりも早期に急性 PN を発症することを示した点にあるが、本研究においても、複数回投与後の急性 PN の累積発症率は、高用量群と低用量群で同程度であり、上記の報告と矛盾するものではない。

これまでに、L-OHP 投与 1 コース目で急性 PN を発症しなかった患者はその後慢性 PN を発症してもその大部分は軽度であったとする報告¹¹⁾や、L-OHP の初回投与後 24 時間以内に急性 PN を発症した患者では、初回投与後 24 時間以内に急性 PN を発症しなかった患者に比べて、慢性 PN の発症率が高くなるとの報告¹²⁾がなされている。急性 PN の早期発症は、その後の急性 PN および慢性 PN の発症や重症化のリスク因子である可能性が考えられるため、急性 PN 発症

時期の把握は L-OHP を含む化学療法の副作用コントロールにおいて重要といえる。

GJG の急性または慢性 PN 発症予防効果については、二重盲検無作為化第 III 相試験である GENIUS 試験の L-OHP の投与量は本研究の低用量群に相当するが、GJG はグレード 2 以上の L-OHP 誘発性 PN に対する予防効果は認められず、投与継続により結果的に重篤な慢性 PN を引き起こすとのことで、試験は途中で中止された²⁴⁾。急性 PN について検討した我々の研究においても、低用量群における 1 コース目での急性 PN 発症者数は、GJG 併用患者では 13 例中 6 例 (46.2%)、GJG 非併用患者では 30 例 8 例 (26.7%) であり、GJG 併用患者の方が急性 PN 発症の割合が高く、GENIUS 試験と同様の結果が得られている。一方、高用量投与群における 1 コース目での急性 PN 発症者数は、GJG 併用患者では 9 例中 6 例 (66.7%)、GJG 非併用患者では 19 例中 17 例 (89.5%) であり、GJG 併用患者の方が急性 PN 発症の割合が低かった。本研究では例数が少なく有意差は認められなかったが、今後、高用量群における GJG の有効性についてさらに例数を増やして検討する必要があると考える。

L-OHP 誘発性 PN に対する GJG の有効性を検討する二重盲検無作為化第 II 相臨床試験 (GONE 試験)⁵⁶⁾では、高齢者またはグレード 2 以上における PN の発症を遅らせることが示され、Fukazawa 等は FOLFOX6 治療を受けた患者において、L-OHP 誘発性 PN の治療時は症状発現時に併用投与するよりも、予防投与を行う方が有効であると報告している²³⁾。これらの報告から、GJG は L-OHP 投与時から併用すると、L-OHP 誘発性急性 PN における冷感過敏症状の予防に有効である可能性がある。GJG が効果を発揮するのは急性または慢性 PN のどちらか、また、GJG の至適用量や投与時期についても今後さらなる検討をしていく必要がある。

本研究の限界として、レトロスペクティブなカルテ調査であったため、PN の持続時間などの詳細な記載がない症例も多くグレード評価が困難であったことが挙げられる。また、L-OHP を含むレジメンの多くは外来での通院治療で行われるが、急性 PN の症状が軽度である場合、患者からの申告がないことも多く、その発症を確認できなかったケースが含まれていた可能性がある。本研究結果を実証するために、今後、外来患者においても急性 PN 発症に関する情報が正確に得られる調査票を作成し、プロスペクティブに検討を行う必要があると考える。また、Ca²⁺チャネル阻害薬を併用していた患者においてL-OHP誘発性PNが抑制されたとの報告があるため⁵⁷⁾、今後の調査ではCa²⁺チャネル阻害薬の併用についても調査項目へ追加する必要がある、さらに、糖尿病性末梢神経障害や帯状疱疹などによる神経障害の影響を把握できるよう、次回調査時には調査項目へ既往歴を追加する必要があると考えられる。

本研究の結果より、初回投与量が高用量となるレジメンにおいては初回投与時から急性PNが発現する可能性が高いことが明らかとなった。そのため、L-OHPを含む化学療法を行う前にはL-OHP誘発性PNについての説明が必須であるが、高用量においては低用量の場合よりも特に初回から急性PNについての説明を充分行う必要があると考えられる。外来治療においても薬剤師が初回投与開始前に冷感刺激を避ける等の指導や投与後の副作用確認を行うことは、L-OHPを含む化学療法における急性PNの誘発や重症化の防止において重要である。

総括

ラットにおいて、L-OHP 投与により *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* の発現が亢進することを示し、RG は過剰発現した *TRPM8* および *TRPA1 mRNA* を抑制することによって、L-OHP 誘発性冷感過敏を緩和することを示した。今後 TRPM8 および TRPA1 受容体タンパク質についても RG による抑制を確認する必要があると考えられる。本研究の結果、ラットにおいて GJG の L-OHP 誘発性冷感過敏に対し効果を示す有効成分が構成生薬 10 種から RG を構成する 6 つの生薬へ絞り込む事ができた。今後さらに RG の構成成分の絞り込みを行い、有効成分を明らかにするとともにその作用メカニズムについても精査し、臨床での応用を視野に入れ、投与量、投与方法および投与時期などについても詳細に検討していく必要があると考えられる。

臨床において、L-OHP 誘発性慢性 PN 発症の影響因子が L-OHP の累積投与量であるのに対し、L-OHP 誘発性急性 PN 発症の影響因子が初回投与量であることが示された。化学療法施行前に患者に対し悪心および嘔吐、骨髄抑制などの一般的な副作用の説明に加えて、L-OHP の初回投与量が高用量となる場合には、低用量の場合よりも特に急性 PN について十分な説明を行うことが重要である。急性 PN の予防法としては冷感刺激を避けるため、日常生活への具体的なアドバイスを行うことが慢性 PN の重症化を避ける上でも必要であると考えられる。現在は急性 PN の予防薬として有効性が確立されているものはないため、新たな予防薬の研究についても今後の課題としたい。

次に GJG の L-OHP 誘発性急性 PN に対する予防効果について検討したところ、L-OHP を高用量投与した群では急性 PN を抑制する傾向がみられた。今後さらに例数を追加して、L-OHP

の投与量が高用量である群における GJG の急性 PN に対する予防効果を検討していく必要があると思われる。

本研究では、L-OHP 誘発性冷感過敏に対する RG の有効性と急性 PN の影響因子が初回投与量であることを示した。L-OHP を含む化学療法を有効かつ安全に使用するための一助となる結果であり、今後さらなる検討が必要である。

出版目録

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

1. Kanako Shimizu, Yoshinori Kato, Hiroyoshi Nakamura, Harumi Yamada. 2018.

Rokumigan alleviates oxaliplatin-induced cold hypersensitivity by suppression of transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 and subfamily A member 1 Traditional & Kampo Medicine, Traditional & Kampo Medicine - Article
<https://doi.org/10.1002/tkm2.1205>

2. 清水加奈子,加藤芳徳,中村裕義,山田治美.オキサリプラチンによる急性末梢神経障害発症の危険因子の解析:医療薬学 2018;44(12):623-630

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜り、また本論文の御校閲をいただきました国際医療福祉大学大学院薬学研究科山田 治美教授に深く感謝しますとともに、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始的確な御指導、御鞭撻を賜り、そして本論文の御校閲をいただきました国際医療福祉大学大学院薬学研究科中村 裕義教授に深く感謝しますとともに、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始適切な御助言と多大なる御協力を賜り、そして本論文の御校閲をいただきました国際医療福祉大学大学院薬学研究科加藤 芳徳講師に深く感謝しますとともに、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、御助言を賜りました武田 弘志学部長、御協力いただいた前澤 佳代子准教授、宮川 和也講師、伊東 岳助教、杉山 奈津子助手に深く感謝しますとともに、謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なるご協力をいただきました国際医療福祉大学 薬物動態学研究室の皆様に深く感謝いたします。

本研究に際し、多大なるご協力をいただきました国際医療福祉大学三田病院 薬剤部の皆様に深く感謝いたします。

最後に本研究の遂行および本論文の作成を陰で支えてくれた家族に心から感謝します。

主査・副査名

本学位論文の審査は国際医療福祉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	国際医療福祉大学教授	医学博士	浅野哲
副査	国際医療福祉大学教授	医学博士	百瀬泰行
副査	国際医療福祉大学教授	医学・薬学博士	辻稔

引用文献

- 1) 大腸癌研究会 “大腸癌治療ガイドライン医師用”, 初版, 金原出版, 東京, 2016, 31-38.
- 2) 日本胃癌学会, “胃癌治療ガイドライン医師用”, 第 5 版, 金原出版, 東京, 2018, 26-27.
- 3) 日本膵癌学会膵癌診療ガイドライン改訂委員会編, “科学的根拠に基づく膵臓癌ガイドライン 2016 年版”, 第 4 版, 金原出版, 東京, 2016, 183-185.
- 4) A Grothey, Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. Clin Colorectal Cancer. 2005;5:38-46.
- 5) Saif MW, Reardon J. Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. Ther. Clin. Risk Manag. 2005;1(4):249-258.
- 6) Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G, et al. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. Cancer Treat. Rev. 2007; 34:368-377.
- 7) Ozkan K, Hulya E, Burcu C, Platinum-induced neurotoxicity, World J Clin Oncol. 2017;8:329-335.
- 8) de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first - line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2000;18:2938-2947.
- 9) Argyriou AA, Cavaletti G, Briani C, et al. Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a prospective study in 170 patients with colorectal cancer. Cancer. 2013;119:438-44.

- 10) Velasco R, Bruna J, Briani C, et al. Early predictors of oxaliplatin-induced cumulative neuropathy in colorectal cancer patients. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85:392-398.
- 11) Pachman DR, Qin R, Seisler DK, et al. Clinical course of oxaliplatin-induced neuropathy: results from the randomized phase III trial N08CB (Alliance) . *J. Clin. Oncol*. 2015;33:3416-22.
- 12) Tanishima H, Tominaga T, Kimura M, et al. Hyper acute peripheral neuropathy is a predictor of oxaliplatin-induced persistent peripheral neuropathy. *Support Care Cancer*. 2017;25:1383-1389.
- 13) Kono T, Mamiya N, Chisato N, et al. Efficacy of goshajinkigan for peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011, ID 418481, 8.
- 14) Gamelin L, Boisdron-Celle M, Delva R, et al. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: A retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer, American Association for Cancer. 2004;10:4055-4061.
- 15) Ishibashi K, Okada N, Miyazaki T, et al. Effect of calcium and magnesium on neurotoxicity and blood platinum concentrations in patients receiving mFOLFOX6 therapy: a prospective randomized study. *J. Clin. Oncol*. 2010;15:82-87.

- 16) Kurniali PC, Luo LG, Weitberg AB. Role of calcium/magnesium infusion in oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal cancer patients. *Oncology*. 2010;24(3):289-292.
- 17) Hershman DL, Lacchetti C, Dworkin RH, et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol*. 2014;32:1941-1967.
- 18) Smith EM, Pang H, Cirrincione C, Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2013;309(13):1359-1367
- 19) Nihei S, Sato J, Kashiwaba M, et al. Efficacy and safety of pregabalin for oxaliplatin- and paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013;40(9):1189-1193.
- 20) Graff-Radford SB, Shaw LR, Naliboff BN. Amitriptyline and fluphenazine in the treatment of postherpetic neuralgia. *Clin J Pain*. 2000;16:188-192
- 21) Vrethem M, Boivie J, Arnqvist H, et al. A comparison amitriptyline and maprotiline in the treatment of painful polyneuropathy in diabetics and nondiabetics. *Clin J Pain*. 1997;13:313-323
- 22) Anna F, Robert S, Kinga S. Acute cold allodynia induced by oxaliplatin is attenuated by amitriptyline. *Acta Neurobiol Exp*. 2018;78:315-321
- 23) Fukazawa K, Tsukagoshi M, Ozawa D, et al. Preventive and inhibitory effects of

- goshajinkigan with respect to neurotoxicity induced by mFOLFOX6 in colorectal cancer therapy. *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.* 2011;37:625-630.
- 24) Oki E, Emi Y, Kojima H, et al. Preventive effect of Goshajinkigan on peripheral neurotoxicity of FOLFOX therapy (GENIUS trial): a placebo-controlled, double-blind, randomized phase III study. *Int. J. Clin. Oncol.* 2015;20:767-775.
- 25) Kawashiri T, Egashira N, Kurobe K, et al. L-type Ca^{2+} channel blockers prevent oxaliplatin-induced cold hyperalgesia and TRPM8 overexpression in rats. *Mol. Pain.* 2012;8:7.
- 26) Laing RJ, Dhaka A, ThermoTRPs and Pain, *Neuroscientist.* 2016;22:171-187.
- 27) Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, et al. Windebank AJ. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice. *Mol. Pain.* 2010;6:15.
- 28) Zhao M, Isami K, Nakamura S, et al. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain.* 2012;8:55.
- 29) Kato Y, Tateai Y, Ohkubo M, et al. Gosha-jinki-gan reduced oxaliplatin-induced hypersensitivity to cold sensation and its effect would be related to suppression of the expression of TRPM8 and TRPA1 in rats. *Anticancer Drugs.* 2014;25:39-43.
- 30) Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, et al. Transient Receptor Potential Channel A1 Is

- Directly Gated by Calcium Ions. J Biol Chem. 2007;282(18):13180-13189.
- 31) Kono T, Satomi M, Suno M, et al. Oxaliplatin-induced neurotoxicity involves TRPM8 in the mechanism of acute hypersensitivity to cold sensation. Brain Behav. 2012;2:68-73.
- 32) Mizoguchi S, Andoh T, Yakura T, Involvement of c-Myc-mediated transient receptor potential melastatin 8 expression in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. Pharmacol Rep. 2016;68(3):645-648.
- 33) 田口 恭治.抗悪性腫瘍薬パクリタキセルとオキサリプラチンにより誘発される末梢神経障害に対する Transient receptor potential チャネルの関与. The Pharmaceutical Society of Japan. 2016;136(2).287-296)
- 34) Takahashi H, Nakao R, Hirasaka K, et al. Effects of single administration of Rokumigan (TJ-87) on serum amino acid concentration of 6 healthy Japanese male volunteers. J. Med. Invest. 2007;54:91-98.
- 35) Yamada K, Yagi G, Kanba S. Effectiveness of herbal medicine (Rokumigan and Hachimijiogan) for fatigue or loss of energy in patients with partial remitted major depressive disorder. Psychiatry Clin. Neurosci. 2005;59:610-612.
- 36) Tatsushima Y, Egashira N, Narishige Y, et al. Calcium channel blockers reduce oxaliplatin-induced acute neuropathy: a retrospective study of 69 male patients receiving modified FOLFOX6 therapy. Biomed. Pharmacother. 2013;67:39-42.
- 37) Satoh H. Pharmacological characteristics of Kampo medicine as a mixture of

- constituents and ingredients. *J. Integr. Med.* 2013;11:11-16.
- 38) Ushio S, Egashira N, Sada H, et al. Goshajinkigan reduces oxaliplatin-induced peripheral neuropathy without affecting anti-tumour efficacy in rodents. *Eur J Cancer.* 2012;48(9):1407-1413
- 39) Jasmin L, Kohan L, Franssen M, et al. The cold plate as a test of nociceptive behaviors: description and application to the study of chronic neuropathic and inflammatory pain models. *Pain.* 1998;75:367-382.
- 40) H. Merskey, N. Bogduk. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. *Classification of Chronic Pain, Second Edition*, IASP Task Force on Taxonomy, edited by IASP Press, Seattle, 1994;209-214.
- 41) Attal N, Jazat F, Kayser V, et al. Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain.* 1990;41:235-251.
- 42) Courteix C, Eschali r A. Lavarenne J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain.* 1993;53:81-88.
- 43) Ling B, Authier N, Balayssac D, et al. Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat. *Pain.* 2007;128:225-234.
- 44) Andrew JA, Daniel CB, Clifford JW. Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats, *Mol Pain.* 2005;1:36.
- 45) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time

- quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
- 46) Suzuki Y, Goto K, Ishige A, et al. Antinociceptive mechanism of Gosha-jinki-gan in streptozotocin-induced diabetic animals: role of nitric oxide in the periphery, *Jpn J Pharmacol*. 1999;79(2):169-175.
- 47) Suzuki Y, Goto K, Ishige A, et al. Effects of gosha-jinki-gan, a kampo medicine, on peripheral tissue blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1998;20(4):321-328.
- 48) Suzuki Y, Goto K, Ishige A, et al. Antinociceptive effect of Gosha-jinki-gan, a Kampo medicine, in streptozotocin-induced diabetic mice, *Jpn. J. Pharmacol. Jpn J Pharmacol*. 1999;79(2):169-75.
- 49) Descœur J, Pereira V, Pizzoccaro A, et al. Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med*. 2011;3:266-278.
- 50) Grolleau F, Gamelin L, Boisdron-Celle M, et al. A possible explanation for a neurotoxic effect of the anticancer agent oxaliplatin on neuronal voltage-gated sodium channels, *J Neurophysiol*. 2001;85:2293-2297.
- 51) Tournigand C, Cervantes A, Figer A, et al. OPTIMOX1: A randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a Stop-and-Go Fashion in advanced colorectal cancer-A GERCOR Study. *J. Clin. Oncol*. 2006;24:394-400.

- 52) Loprinzi CL, Qin R, Dakhil SR, et al. Phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of intravenous calcium and magnesium to prevent oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (N08CB/Alliance). *J. Clin. Oncol.* 2014;32:997-1005.
- 53) 今井 徹,早坂正敏,中馬真幸ら.FOLFOX 4 療法における末梢神経障害発症に関与する臨床的因子の検討,医療薬学 2010;36:347-351.
- 54) Argyriou AA, Velasco R, Briani C, et al. Peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (FOLFOX) or capecitabine (XELOX): a prospective evaluation of 150 colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2012;23:3116-3122.
- 55) Storey DJ, Sakala M, McLean CM, et al. Capecitabine combined with oxaliplatin (CapOx) in clinical practice: how significant is peripheral neuropathy?. *Ann Oncol.* 2010;21:1657-61.
- 56) Kono T, Hata T, Morita S, et al. Goshajinkigan oxaliplatin neurotoxicity evaluation (GONE): a phase 2, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of goshajinkigan to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013;72:1283-1290.
- 57) Yoko T, Nobuaki E, Yuri N, et al. Calcium channel blockers reduce oxaliplatin-induced acute neuropathy: A retrospective study of 69 male patients receiving modified FOLFOX6 therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2013;67:39-42