

前立腺癌治療薬エストラムスチン（エストラサイト®）で誘発されるフェレットにおける悪心・嘔吐に対する5-HT₃ 受容体拮抗薬の効果

東岡 雅也, 山口 絵美, 高取 真吾
田中 充士, 興井 隆
日本新薬株式会社創薬研究所

EFFECT OF THE 5-HT₃ RECEPTOR ANTAGONIST GRANISETRON ON ESTRAMUSTINE PHOSPHATE SODIUM (ESTRACYT®)-INDUCED EMESIS IN FERRETS

Masaya HIGASHIOKA, Emi YAMAGUCHI, Shingo TAKATORI,
Mitsushi TANAKA and Takashi KYOI
Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

Estracyt® is an antimitotic drug used for the treatment of prostate cancer, and its most common adverse effects are nausea and vomiting. In this study, we investigated the effect of a 5-HT₃ receptor antagonist, granisetron, on emesis induced in ferrets by estramustine phosphate sodium (EMP), the active ingredient of Estracyt. To clarify the mechanism of action of EMP-induced emesis, we also investigated the effect of EMP on the release of serotonin (5-HT) in the isolated rat ileum. EMP (3 mg/kg, per os) induced 75.3 ± 10.2 retching episodes and 7.5 ± 1.3 vomiting episodes during a 2-h observation period. The latency to the first emetic response was 58.0 ± 13.5 min. Granisetron (0.1 mg/kg, per os) administered 1 h before the administration of EMP reduced the number of EMP-induced retching and vomiting episodes to 1.3 ± 1.3 and 1.0 ± 1.0, respectively, and prolonged the latency by a factor of almost two. EMP (10⁻⁵ and 10⁻⁴ M) increased 5-HT release from isolated rat ileum, and 10⁻⁷ M granisetron almost completely inhibited the increase induced by 10⁻⁴ M EMP. These results suggest that EMP induces nausea and vomiting via 5-HT release from the ileum, and that 5-HT₃ receptor antagonists may be useful to prevent gastrointestinal adverse effects that occur during treatment with Estracyt.

(Hinyokika Kyo 56 : 361-365, 2010)

Key words : Estramustine, 5-HT₃ receptor antagonist, Emesis, 5-HT (serotonin)

緒 言

前立腺癌は、生活様式の欧米化、人口動態の高齢化、さらには診断法の発達による潜在癌の発見などにより、日本国内で急速な罹患率の上昇が認められる悪性腫瘍の1つである。エストラサイト®は1984年から本邦で使用されている前立腺癌治療薬であり¹⁾、その有効成分であるエストラムスチンが前立腺癌細胞中に多く存在するエストラムスチン結合蛋白質に結合し²⁻⁴⁾、癌組織に集積されてマイクロチューブルの重合阻害による殺細胞作用を発揮する³⁻⁵⁾。また、代謝物であるエストラジオールは、黄体形成ホルモン、テストステロンの生合成および5α-リダクターゼを阻害し、抗アンドロゲン作用を示す^{6,7)}。エストラサイトは優れた前立腺腫瘍縮小効果を示す一方で、服用患者の多くが経験する悪心・嘔吐などの消化器系副作用が生活の質を著しく低下させている⁸⁻¹⁰⁾。エストラサイトによる悪心・嘔吐の発症機序についてはまだ不明

であり、そのため、治療現場において明確な副作用対策を明示できていないのが現状である。

そこで本研究では、エストラサイトによる悪心・嘔吐に対する副作用対策を提案することを目的として、エストラムスチンにより誘発されるフェレットでの悪心・嘔吐に対する5-HT₃ 受容体拮抗薬グラニセトロンの効果を調べた。また、エストラムスチンによる悪心・嘔吐の発症機序を探る目的で、ラット摘出回腸からのセロトニン (5-HT) 分泌に対するエストラムスチンの作用も検討した。

材 料 と 方 法

1. 使用動物

1-1. フェレット

8 週齢の雄性フェレット (1.2~2.0 kg, Marshall BioResources, USA) を購入し、1 週間の予備飼育後試験に供した。フェレットは温度 20~26℃, 湿度 35~75%, 換気15回/h 以上、照明12時間の人工照明

(午前8時～午後8時)の条件下で、固形飼料(ハイデンシテイ フェレットダイエツト 5L14; PMI Feeds; St. Louis, MO, USA) および水道水を自由摂取させ飼育した。動物実験は動物の愛護および管理に関する法律(1973年10月1日法律第105号, 2006年6月1日最終改正)に従い実施した。なお, すべての動物実験計画および手順は, 事前に日本新薬動物実験委員会において審査され, 承認されたものである。

1-2. ラット

8週齢のSlc:SD系雄性ラット(日本エスエルシー, 浜松)を購入し, 1週間の予備飼育後試験に供した。ラットは温度20～26℃, 湿度35～75%, 換気15回/h以上, 照明12時間の人工照明(午前8時～午後8時)の条件下で, 固形飼料(F-2; フナバシファーム, 船橋)および水道水を自由摂取させ飼育した。動物実験は動物の愛護および管理に関する法律(1973年10月1日法律第105号, 2006年6月1日最終改正)に従い実施した。なお, すべての動物実験計画および手順は, 事前に日本新薬動物実験委員会において審査され, 承認されたものである。

2. 使用薬物

エストラムスチン(リン酸エステルナトリウム塩: 日本新薬, 京都)を動物に投与する場合は, 生理食塩液(大塚生食注, 大塚製薬工場, 鳴門)で溶解し調製した。0.5%メチルセルロース溶液はメチルセルロース(メトローズ SM-400, 信越化学工業)を蒸留水(大塚蒸留水, 大塚製薬工場, 鳴門)に溶解し調製した。グラニセトロン(塩酸塩: Sigma, St. Louis, MO, USA)を動物に投与する場合は0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した。その他の試験では蒸留水に溶解した。

3. フェレットを用いた悪心・嘔吐反応の評価

フェレットを用いた悪心・嘔吐反応の評価は, Florczyk らの方法¹¹⁾をもとに行った。本実験は, エストラムスチン投与前にグラニセトロンを0, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 mg/kgで投与する5群(N=4)で行い, 20匹のフェレットを使用した。悪心および嘔吐の指標として, 腹部のリズミカルな収縮運動(retching)および消化管内容物の吐き行動(vomiting)の回数をそれぞれ測定した。薬物投与前にフェレットを観察用ケージに入れて1時間以上順化させた。グラニセトロンはエストラムスチン投与の1時間前に0.5%メチルセルロース懸濁液として2 ml/kgの容量にて経口投与し, vehicleとして0.5%メチルセルロース溶液を投与した。エストラムスチン溶液(1.5 mg/ml)を2 ml/kgの容量にて経口投与し, その後2時間におけるretchingおよびvomitingの回数, ならびにretchingまたはvomitingの初回発現時間(latency)をビデオカメラを用いて観察・計測した。なお, 2時間の測定時間

内にretchingまたはvomitingを発現しなかった個体については, latencyを120分として解析を行った。

4. ラット摘出回腸からの5-HT分泌量の測定

ラット摘出回腸からの5-HT分泌量の測定はEndoらの方法^{12,13)}をもとに行った。5-HT分泌に対するエストラムスチンの影響を調べる実験は, エストラムスチンを0, 10^{-5} および 10^{-4} Mで処置する3群(N=5)で行い, 15匹のラットを使用した。また, エストラムスチン誘発5-HT分泌に対するグラニセトロンの影響を調べる実験は, エストラムスチン無処置ならびにエストラムスチン処置前にグラニセトロンを0, 10^{-7} および 10^{-6} Mで処置する4群(N=6)で行い, 24匹のラットを使用した。エーテル麻酔下で回腸を摘出後2～3 cmの長さに切り, 腸管を切開してKrebs solution(組成は以下の通り: NaCl 111.0 mM, KCl 5.9 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11.5 mM)を満たしたマグヌス管に懸垂した。回腸標本に1 gのテンションを負荷して30分間平衡化し, 30, 60分後にKrebs solutionの回収と交換を行った。次にエストラムスチンを添加し, 30, 60分後にKrebs solutionの回収と交換を行った。実験終了後, 回腸標本の重量を測定し, 回収したKrebs solution中に含まれる5-HT量をHPLC(Eicompak CA-5 ODS, エイコム, 京都)により測定した。5-HT分泌量は, エストラムスチン処置後60分間における標本1 gあたりの累積5-HT分泌量(ng/g of tissue/h)を, 処置前60分間の分泌量に対する変化率(%)で示した。

グラニセトロンはエストラムスチン処置の30分前から添加した。グラニセトロン存在下における5-HT分泌量変化は, 以下の式により算出した。

$$5\text{-HT release (\%)} = 1/2 \times a/b \times 100$$

a: エストラムスチン処置後60分間における5-HT分泌量

b: プレインキュベーション30分間における5-HT分泌量

5. 統計解析

Retching, vomiting および latency の各測定値は, 平均値±標準誤差で示した。5-HT分泌量はエストラムスチン処置前における標本1 gあたりの5-HT分泌量(ng/g of tissue)を100%とした時の変化率(%)で算出し, 平均値±標準誤差で示した。有意差検定は, 多群の場合はDunnettの多重検定(両側)により行い, 2群の場合にはStudentの両側t検定により行った。いずれの統計手法もSASシステム(Version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行い, 危険率5%未満を有意と判定した。

結 果

1. エストラムスチン誘発悪心・嘔吐に対する 5-HT₃ 受容体拮抗薬の影響

フェレットに 3 mg/kg のエストラムスチンを経口投与すると、投与したすべての個体で投与後 58.0 ± 13.5 分を latency とする retching (75.3 ± 10.2 回) および vomiting (7.5 ± 1.3 回) が認められた (Table 1). 5-HT₃ 受容体拮抗薬グラニセトロン ($0.003 \sim 0.1$ mg/kg) をエストラムスチン投与 1 時間前に経口投与すると 0.003 mg/kg から retching および vomiting 回数を有意に減少させ (Table 1), その抑制率は 0.1 mg/kg ではそれぞれ 98.3% および 86.7% であった (Table 1). また, 0.1 mg/kg では latency を 58.0 ± 13.5 分から 113.3 ± 6.8 分に有意に延長させた (Table 1).

2. ラット摘出回腸からの 5-HT 分泌に対するエストラムスチンの影響

エストラムスチンを摘出回腸に 1 時間暴露すると、無処置群 ($142.0 \pm 10.7\%$) と比較して有意なセロトニン分泌促進作用が認められた (10^{-5} M, $193.1 \pm 9.7\%$; 10^{-4} M, $216.6 \pm 14\%$) (Fig. 1). エストラムスチン (10^{-4} M) によるセロトニン分泌量の増加は、グラニセトロン (10^{-7} および 10^{-6} M) の前処置により、それぞれ 89.2% および 89.7% 減少した (Fig. 2).

考 察

嘔吐のモデル動物であるフェレットを用いて、5-HT₃ 受容体拮抗薬グラニセトロンがエストラムスチンにより誘発される悪心・嘔吐反応を抑制することを見出した。フェレットは、制吐剤の臨床効果を予測するのに適したモデル動物であり^{11,14)}、これまで 5-HT₃ 受容体拮抗型制吐剤やニューロキニン受容体拮抗型制吐剤の開発に広く用いられている¹⁵⁻¹⁷⁾。本研究で用いたエストラムスチンおよびグラニセトロンの濃度が、それぞれ臨床用量に近い 3 mg/kg (通常成人 1 回 313.4 mg を経口投与する) および 0.1 mg/kg (通常成人 1 回 2 mg を経口投与する) であったこと

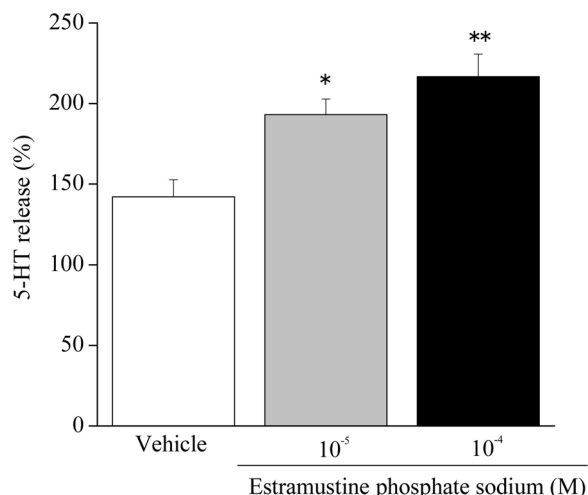


Fig. 1. Effect of estramustine phosphate sodium on 5-HT release from isolated rat ileum. Columns and bars represent the mean and SEM (N=5). * P<0.05, ** P<0.01, compared with the vehicle-treated group (Dunnett's test).

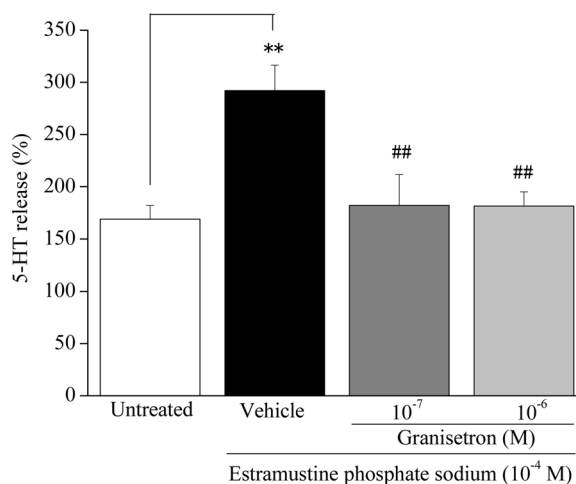


Fig. 2. Effect of granisetron on estramustine phosphate sodium-induced 5-HT release from the rat ileum. Columns and bars represent the mean and SEM (N=6). ** P<0.01, compared with the untreated group (Student's t-test). ## P<0.01, compared with the vehicle-treated group (Dunnett's test).

Table 1. Effect of granisetron on emetic responses induced by estramustine phosphate sodium in ferrets

Treatment	Dose (mg/kg, p.o.)	n	Retching		Vomiting		Latency ^c (min)
			No. ^a	Mean ^b	No. ^a	Mean ^b	
Vehicle		4	4	75.3 ± 10.2	4	7.5 ± 1.3	58.0 ± 13.5
Granisetron	0.003	4	4	35.8 ± 16.1*	3	3.0 ± 1.6*	78.2 ± 15.3
	0.01	4	4	17.0 ± 4.4**	3	1.3 ± 0.5**	89.1 ± 7.2
	0.03	4	2	14.0 ± 9.5**	2	1.3 ± 1.0**	93.0 ± 15.6
	0.1	4	1	1.3 ± 1.3**	1	1.0 ± 1.0**	113.3 ± 6.8*

Animals were observed for 2 h after oral administration of estramustine phosphate sodium (3 mg/kg). Granisetron was orally administered 1 h before estramustine phosphate sodium. a: Number of animals in each group showing this response. b: Mean number of episodes (± SEM). c: Mean time to the first emetic response (± SEM). * P<0.05, ** P<0.01, compared with the vehicle-treated group (Dunnett's test).

から、グラニセトロンがエストラサイト服用患者の悪心・嘔吐に対して予防効果を示す可能性が十分考えられる。

エストラムスチンが摘出ラット回腸からの 5-HT 分泌を促進し、その分泌促進作用をグラニセトロンが抑制することを明らかにした。制癌剤であるシスプラチンによる即時型の悪心・嘔吐の発症機序として、シスプラチンが小腸エンテロクロマフィン (EC) 細胞を刺激して 5-HT の分泌を促進し、それが迷走神経求心性線維末端の 5-HT₃ 受容体を活性化し、その興奮により延髄嘔吐中枢刺激が亢進することが知られている^{14,18,19)}。また、シスプラチンは分布した組織で制癌作用にも関わるラジカルを生成し、このラジカルが小腸 EC 細胞を刺激して 5-HT 分泌を促進するものと考えられている²⁰⁾。エストラムスチンがいかなる機構で EC 細胞を刺激するかについては不明であるが、エストラムスチンによる摘出ラット回腸からの 5-HT 分泌促進作用には、EC 細胞上の 5-HT₃ 受容体活性化による 5-HT 分泌が関与していることが示唆された。以上の結果から、グラニセトロンはエストラムスチンによる消化管からの 5-HT 分泌およびその 5-HT による迷走神経求心性線維末端の 5-HT₃ 受容体活性化の両方を遮断することによって抗悪心・嘔吐作用を示すことが示唆された。

結 語

5-HT₃ 受容体拮抗薬グラニセトロンは、エストラムスチンにより誘発されるフェレットの悪心・嘔吐回数を減少し、悪心または嘔吐の初回発現時間を延長した。エストラムスチンによる悪心・嘔吐にはエストラムスチンによる回腸からの 5-HT 分泌促進作用が関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Perry CM and McTavish D: Estramustine phosphate sodium. a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer. *Drug Aging* **7**: 49-74, 1995
- 2) Forsgren B, Björk P, Carlström K, et al.: Purification and distribution of a major protein in rat prostate that binds estramustine, a nitrogen mustard derivative of estradiol-17 β . *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3149-3153, 1979
- 3) Yamanaka H, Imai K, Yuasa H, et al.: Mechanism of retention of estramustine in the rat prostate and results of a clinical trial of Estracyt[®] in Japan. *Prostate Suppl* **1**: 95-102, 1981
- 4) Norlén BJ, Andersson SB, Björk P, et al.: Uptake of estramustine phosphate (estracyt[®]) metabolites in prostatic cancer. *J Urol* **140**: 1058-1062, 1988
- 5) Hartley-Asp B: Estramustine-induced mitotic arrest in two human prostatic carcinoma cell lines DU 145 and PC-3. *Prostate* **5**: 93-100, 1984
- 6) Yamanaka H, Shimazaki J, Imai K, et al.: Effect of estracyt[®] on the rat prostate. *Invest Urol* **14**: 400-404, 1977
- 7) Fritjofsson A, Norlén BJ, Högborg B, et al.: Hormonal effects of different doses of estramustine phosphate (Estracyt[®]) in patients with prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* **15**: 37-44, 1981
- 8) Nishio S, Kishimoto T, Maekawa M, et al.: Clinical effects of estramustine phosphate disodium (Estracyt[®]) on prostatic cancer. *Hinyokika Kyo* **32**: 1763-1770, 1986
- 9) Asakawa M, Wada S, Hayahara N, et al.: Clinical study of estramustine phosphate disodium (Estracyt[®]) on prostatic cancer: results of long-term therapy for 38 patients with prostatic cancer. *Hinyokika Kyo* **36**: 1361-1369, 1990
- 10) Fukuoka H, Ishibashi Y, Sakai N, et al.: The evaluation of the effect of estracyt[®] on prostatic cancer. *Hinyokika Kyo* **37**: 91-97, 1991
- 11) Florczyk AP, Schurig JE and Bradner WT: Cisplatin-induced emesis in the Ferret: a new animal model. *Cancer Treat Rep* **66**: 187-189, 1982
- 12) Endo T, Minami M, Kitamura N, et al.: Effects of various 5-HT₃ receptor antagonists, granisetron, ondansetron, ramosetron and azasetron on serotonin (5-HT) release from the ferret isolated ileum. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **104**: 145-155, 1999
- 13) Endo T, Hamaue N, Ihira E, et al.: Effect of granisetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on 5-hydroxytryptamine (5-HT) release from the isolated ileum in a delayed-emesis rat model. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **111**: 55-68, 2002
- 14) Naylor RJ and Rudd JA: Mechanisms of chemotherapy/radiotherapy-induced emesis in animal models. *Oncology* **53**: 8-17, 1996
- 15) Bermudez J, Boyle EA, Miner WD, et al.: The anti-emetic potential of the 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonist BRL 43694. *Br J Cancer* **58**: 644-650, 1988
- 16) Morrow GR, Hickok JT and Rosenthal SN: Progress in reducing nausea and emesis. comparisons of ondansetron (Zofran), granisetron (Kytril), and tropisetron (Navoban). *Cancer* **76**: 343-357, 1995
- 17) Tattersall FD, Rycroft W, Cumberbatch M, et al.: The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology* **14**: 652-663, 2000
- 18) Andrews PL, Rapeport WG and Sanger GJ: Neuropharmacology of emesis induced by anti-cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **9**: 334-341, 1988
- 19) Minami M, Endo T, Hamaue N, et al.: Serotonin and anticancer drug-induced emesis. *Yakugaku Zasshi*

124 : 491-507, 2004

Eur J Pharmacol **248** : 131-135, 1993

- 20) Torii Y, Mutoh M, Saito H, et al. : Involvement of free radicals in cisplatin-induced emesis in *Suncus murinus*.

(Received on January 7, 2010)
(Accepted on March 8, 2010)