がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎動物モデルの作製および口腔粘膜炎治療薬に関する基礎的研究

2014

中島　貴子

目次

略語一覧 1

第１章　序論 2

第２章　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルの作製の検討 8

第１節　緒言 8
第２節　実験材料及び方法 9
第１項　実験材料 9
(1)　実験動物
第２項　実験方法 10
(1)　ラット口腔内潰瘍の作製方法
(2)　口腔内潰瘍の肉眼的及び病理組織学的評価
第３節　実験結果 11
第１項　ラット焼灼口腔内潰瘍モデルの経日的な潰瘍面積変化 11
第２項　ラット焼灼口腔内潰瘍モデルの経日的な病理組織学的変化 12
第４節　考察 15
第５節　小括 17

第３章　Ｘ線照射によるラット口腔粘膜炎モデル作製の検討 18

第１節　緒言 18
第２節　実験材料及び方法 20
第１項　実験材料 20
(1)　試薬
(2)　機器
(3)　動物
第２項　実験方法 21
(1)　X 線照射
(2)　放射線照射後における遺伝子の経時変化
(3)　放射線照射後における遺伝子の経日変化
(4)　傷害面積の測定
(5)　組織学的検討
(6)　RNA の調製
(7)　リアルタイム PCR による解析
(8)　X 線照射による舌炎に対する palifermin の効果
(9)　統計解析
第３節　実験結果 25
第１項　X 線照射後の体重の経日変化 25
第２項　摂水量・摂餌量の経日変化 26
第３項　舌の傷害面積の経日変化 27
第４項　舌の病理組織学的所見の経日変化 28

第５項　IL-6, L-1β, TNFα, CXCL1 及び CCL2 の遺伝子発現量の経日変化及び経時変化 31
第６項　X 線照射による舌炎に対する Palifermin の効果 34
第４節　考察 35
第５節　小括 37

第４章　ラット口腔粘膜炎モデルに対して有効なレバミピド液剤の開発 38

第１節　緒言 38
第２節　実験材料及び方法 40
第１項　実験材料 40
(1)　試薬
(2)　機器
(3)　動物
第２項　実験方法 42
(1)　レバミピド液剤の調製
(2)　ラット口腔内潰瘍モデルを用いた各種レバミピド液剤の治癒促進効果の検討
(3)　レバミピド液剤の口腔内及び胃内投与後の血漿中及び口腔粘膜内濃度の測定
(4)　ラット放射線誘発舌炎モデルを用いたレバミピド液剤の効果
第３節　実験結果 47
第１項　レバミピド液剤の調製 47
第２項　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルにおける各種レバミピド液剤の潰瘍面積縮小効果 48
第３項　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルにおける１%、２%および４%レバミピド液剤の潰瘍面積縮小効果 51
第４項　レバミピド液剤の口腔内粘膜組織への分布 53
第５項　X 線照射によるラット口腔粘膜炎モデルに対するレバミピド液剤の効果 55
第４節　考察 57
第５節　小括 60

第５章　総括 61

謝辞 64

引用文献 65

略語一覧

CMCNa:	Carboxymethylcellulose sodium
CTCAE Ver3.0:	Common Terminology Criteria for Adverse Events
EBV:	Epstein-Barr Virus:
H&E:	Hematoxylin & Eosin
HPC:	Hydroxypropylcellulose
HPMC:	Hydroxypropylmethylcellulose
HPV:	Human papillomavirus
IL-1β:	Interleukin-1β
IL-6:	Interleukin-6
KGF:	keratinocyte Growth factor
PAS:	Periodic acid-Schiff
PCR:	Polymerase chain reaction
PTC:	Professional Teeth Cleaning
PVP:	Polyvinylpyrrolidone
QOL:	Quality of life
TNFα:	Tumor Necrosis Factor α

第１章　　序論

がんの治療に伴う口腔粘膜炎は、頻繁に認められる重要な有害事象であるが、未だ有効な予防・治療法が開発されていない。特に、口腔領域が照射野に入る化学放射線療法を受けた頭頸部がん患者のほぼ全ての患者に、口腔粘膜炎が発症すると報告されている[1, 2)]。頭頸部がんの発症原因は、飲酒喫煙によるものが多数を占めるが、EB ウィルス（Epstein-Barr Virus: EBV）やヒトパピローマーウィルス（Human papillomavirus: HPV）も発症に関与している。日本における頭頸部がんの死亡数は、がん死亡率の 2.3%を占め、近年、男女ともに増加傾向にある。これら頭頸部がんの 90%が扁平上皮がんである。局所進行頭頸部がんに対する治療法では、従来から放射線を用いた治療が行われているが、治療成績は満足できるものではなかった。そこで、治療成績向上を目指し、抗がん剤を放射線療法に加える化学放射線療法を用いることで、生存率の向上が見られるようになった。しかしながら、がん化学放射線療法は、白血球減少等の骨髄毒性、吐き気、食欲低下、重篤な粘膜炎、皮膚炎、口腔内乾燥、味覚障害並びに嚥下障害等が生じることが報告されている（図 1-1）。特に、口腔粘膜炎の多くは疼痛を伴い、摂食障害や嚥下障害などにより栄養状況の低下をきたす。また、経口摂取が困難になると口腔内が不衛生となり細菌増殖が起こり、誤嚥による肺炎等の 2 次感染を引き起こす原因となる。さらに、全身状態の低下・免疫力の低下に伴い、口腔内細菌の増殖が生じることにより、最悪な場合、敗血症など、致命的な合併症の原因となる。このように、がん治療に伴う口腔粘膜炎は、がん治療中の患者のクオリティー・オブ・ライフ（QOL）を著しく低下させる[1)]。このように、頭頸部がんに対するがん化学放射線療法は重篤な口腔粘膜炎を発症させ、患者の QOL が著しく低下するのみならず、がん治療の完遂が困難になり、治療効果の低下にまで至る重要な問題となっている[3, 4)]。従って、頭頸部がん患者の化学放射線療法の遂行のためには、口腔粘膜炎に対する有効な治療法が望まれている。

Sonis らは、がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症機序として、以下のような 5 段階の発症過程を提案している（図 1-2）[5, 6)]。

①開始期 (initiation):　抗がん剤投与や放射線照射等により、活性酸素種やフリーラジカルにより DNA の損傷が生じる。

②シグナル伝達期 (upregulation and message generation):　NF-κB 等の転写因子が活性化される。

③シグナル増幅期 (amplification and signaling):　炎症性サイトカインが産生され、シグナル分子が増幅され、上皮細胞障害も生じる。

④潰瘍期 (ulceration):　潰瘍が形成され、炎症性細胞が粘膜下組織に湿潤する。局所細菌感染も生じる。

⑤治癒期 (healing)

このように、放射線あるいは化学療法が引き起こす口腔粘膜炎の発症機序は理解されつつあるが、その発症機序は非常に複雑であり、完全に解明されるまでには至って

いない。

がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎に対する支持療法として、一部施設では、歯科や看護師、薬剤師との連携により、口腔ケア並びに疼痛管理が行なわれている。口腔ケアは、治療開始前に歯科衛生士が行うスケーリング（歯石除去）と PTC（Professional Teeth Cleaning）を基本としている。治療中は、歯磨き等により、口腔内をきれいにするとともに、唾液腺の働きが弱まることから、口腔乾燥をきたすため、含嗽液を用いた口腔内の保湿が行なわれている。また、口腔粘膜炎の進行とともに、疼痛コントロールとして、鎮痛剤並びに医療用麻薬が用いられている。しかしながら、口腔ケアにも限界があり、口腔粘膜炎の進行の完全な抑止は極めて困難である[7)]。

口腔粘膜炎の疼痛管理は、主に CTCAE Ver3.0（Common Terminology Criteria for Adverse Events：有害事象共通用語基準）のグレードを用い、疼痛のコントロールが行なわれている[8)]。CTCAE Ver3.0 による口腔粘膜炎のグレードを表 1-1 に示す。口腔粘膜の紅斑・むくみを生じる時期をグレード 1 とし、ハチアズレ水等による含嗽剤を 1 日 6 回～8 回程度、含嗽する。グレード 2 では、斑状の潰瘍又は偽膜形成が出現し、痛みを伴うため、この時期の治療方法としては、局所麻酔薬入り含嗽剤が用いられている。グレード 3 以上になると、痛みや軽い刺激による出血が生じ、水分並びに固形物の経口摂取が困難となるため、栄養摂取は胃瘻や中心静脈栄養に切り替えられ、オピオイド系鎮痛剤並びに局所麻酔薬入り含嗽によりケアが行なわれる。このように口腔粘膜炎が発症しても、エビデンスのある治療方法が少ないため、現状では対症療法しかない状況にある。

また、放射線や抗がん剤による口腔粘膜炎の発症過程には酸化的ストレスが関与すると考えられていることから、抗酸化剤としてのビタミン E、グルタミン、アロプリノール及び抗炎症作用を有するアズレンスルホン酸が使用されることもある。口腔粘膜保護の目的でスクラルファートやプロスタグランジン E1 誘導体の予防効果について臨床試験が行われたが、これまでのところ明確な口腔粘膜炎予防効果を発揮する薬剤はない[9)]。

海外においては、ラジカルスカベンジャーである amifostine が頭頸部がん患者の放射線療法による口腔乾燥症に対して効能を持っており、Ethyol という商品名で発売されているが、口腔粘膜炎に対する効能は取得出来ていない。唯一の口腔粘膜炎治療薬として、ケラチノサイト増殖因子（keratinocyte growth factor: KGF）である palifermin が造血幹細胞移植患者の口腔粘膜炎に対して米国で承認されている。しかし、KGF は増殖因子であるため、がん増殖刺激の危険性が使用上の注意に記載されており、扁平上皮がんが多い頭頸部がんに対しては承認されていない。また、amifostine と palifermin は、共に注射剤であることから使用は限定的であり、さらに amifostine は重篤な皮膚反応や過敏症が、palifermin は皮膚障害や感覚異常が報告されており、安全性も危惧される[10, 11)]。両薬剤は、現在のところ日本では承認されていない。

以上のように、頭頸部がんに対するがん放射線化学療法に伴う重篤な口腔粘膜炎は、がんに対する治療成績の低下をも引き起こす可能性がある重要な問題であるが、現在

のところ口腔粘膜炎に対する有効な治療法がない。そこで、筆者は、口腔内粘膜炎に対する予防・治療薬候補の薬効評価のための口腔粘膜炎動物モデルの確立とそれらのモデルを用いた口腔粘膜炎治療薬の製剤処方設計及びその薬効評価を行った。

口腔粘膜炎に対する新しい薬剤の開発のためには、動物を用いた簡便で再現性の高い口腔粘膜炎モデルが必要である。口腔粘膜炎モデルとして、酢酸潰瘍ラット口腔粘膜炎モデルが知られているが、再現性や口腔粘膜炎の重篤度の点で問題が残されていた。筆者は、薬剤スクリーニングや製剤設計に有用なモデルとして、頬粘膜にモノポーラーをあてて粘膜の一部を焼灼する焼灼法を用いたラット口腔粘膜炎モデルを新たに開発した。焼灼法を用いたラット口腔粘膜炎モデルの開発で得られた知見を第 2 章に論述する。

放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎の治療への薬剤の有用性を評価するためには、臨床における放射線療法と類似した動物モデルでの評価が望まれる。筆者は、臨床における放射線療法を反映した動物モデルとして、高線量の X 線をラットの口吻部のみに単回照射することによって舌炎を惹起する放射線誘発舌炎ラットモデルを開発した。本放射線誘発舌炎ラットモデルの開発で得られた知見を第 3 章に論述する。

レバミピド（化学名：(±)-2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl]propionic acid）は大塚製薬株式会社で合成されたキノリノン誘導体である[12)]。レバミピドは胃潰瘍及び胃炎の胃粘膜病変の改善薬として日本及びアジア各国で販売されている（図 1-3）。また、レバミピドのマイクロ粒子の懸濁液がドライアイの治療薬として日本で販売されている。レバミピドの主な薬理作用として、胃粘膜の内因性プロスタグランジン増加作用[13-15)]及び胃粘膜傷害の発症因子の 1 つであるフリーラジカル抑制作用[16-19)]が報告されている（図 1-4）。レバミピドの口腔粘膜炎に対する効果も検討されており、放射線療法前にレバミピドを含む含嗽液で含嗽することにより、放射線療法による口腔粘膜炎の予防に効果があることが臨床のパイロット試験において報告されている[20-23)]。そこで、筆者らは、より高い口腔粘膜炎に対する治癒促進効果を有するレバミピドの製剤化を目的として、焼灼法によるラット口腔内潰瘍モデルの口腔粘膜炎治癒促進効果を指標に、サブミクロンのレバミピド粒子を含むレバミピド液剤の作製を試みた。また臨床に近似した薬効モデルとして、ラット放射線誘発舌炎モデルを用いて、放射線障害で誘発された口腔粘膜炎に対するレバミピド液剤の予防・治癒効果を評価した。レバミピド液剤の作製で得られた知見を第 4 章に論述する。

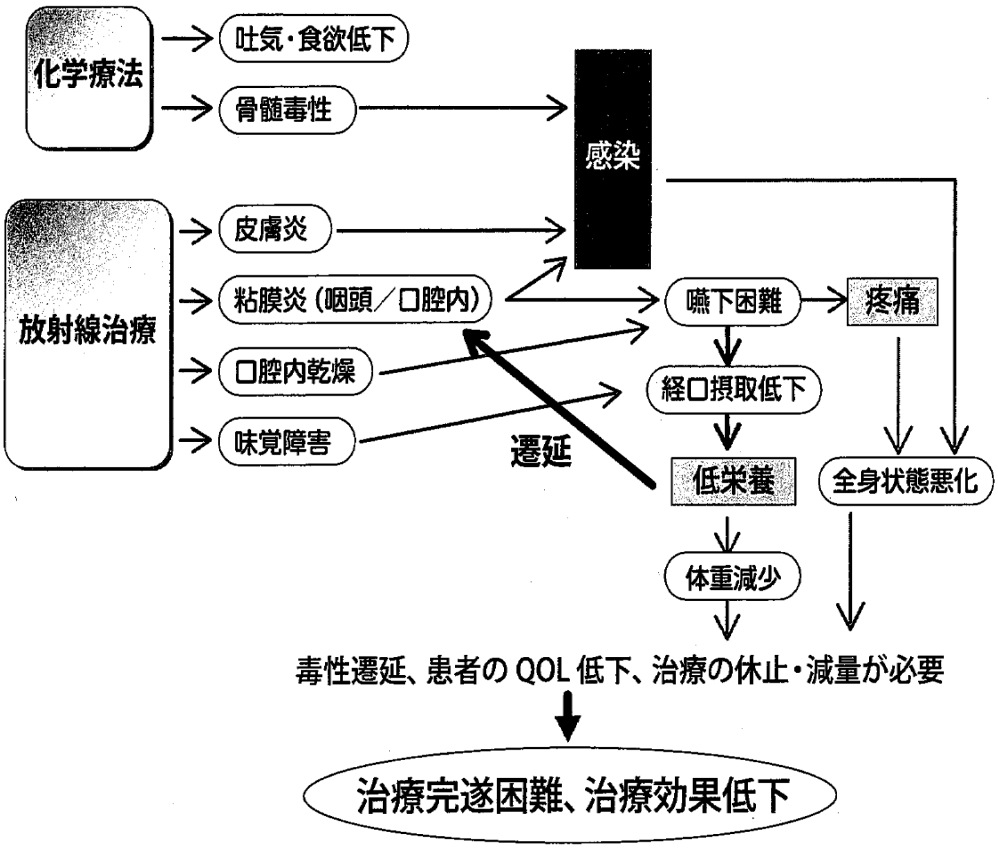


図 1-1　　頭頸がんの化学放射線療法における副作用 [7)]

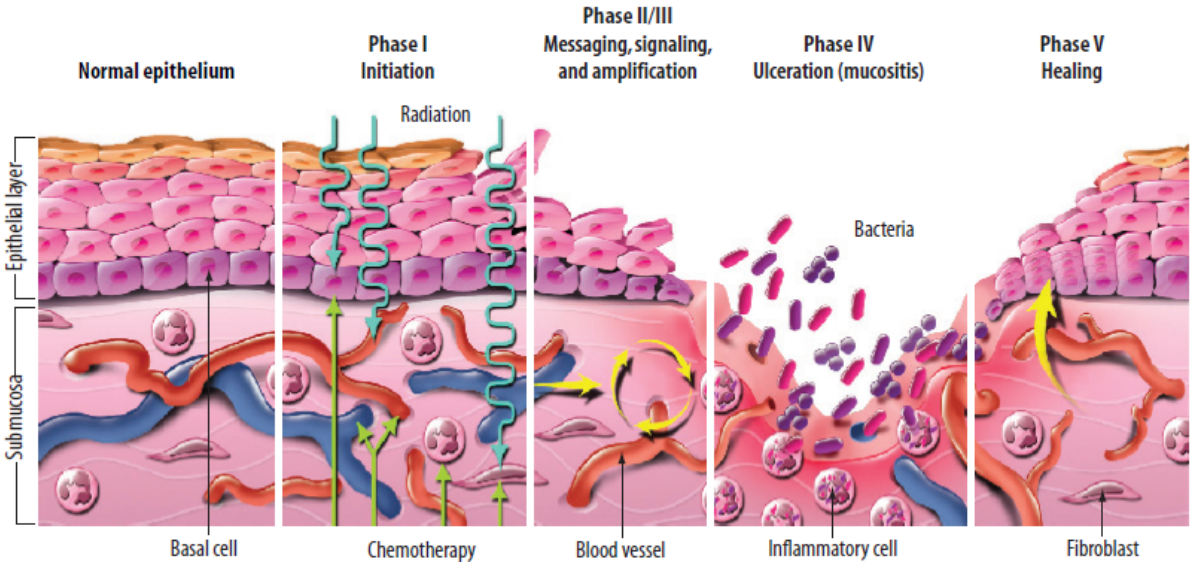
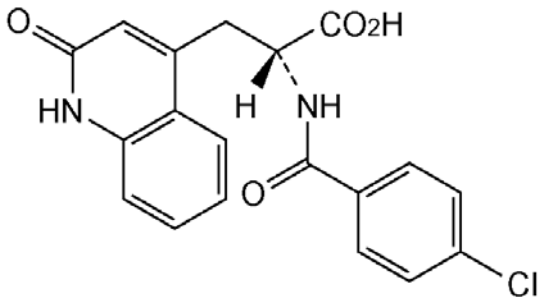


図 1-2　　がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症過程 [6)]

表 1-1　　CTCAE Ver3.0による口腔粘膜炎の評価

	診察所見	機能／症状
Grade 1	粘膜の紅斑	わずかな症状で摂食に影響なし
Grade 2	斑状潰瘍または偽膜	症状があるが，食べやすく加工した食事を摂取し嚥下することはできる
Grade 3	融合した潰瘍または偽膜 ;わずかな外傷で出血	症状があり，十分な栄養や水分の経口摂取ができない
Grade 4	組織の壊死;顕著な自然出血;生命を脅かす	生命を脅かす症状がある
Grade 5	死亡	死亡



及び鏡像異性体

効能効果

・胃潰瘍

・下記疾患の胃粘膜病変（びらん、出血、発赤、浮腫）の改善

急性胃炎、慢性胃炎の急性増悪期

・ドライアイ

図 1-3　　レバミピドの化学構造式及び効能効果

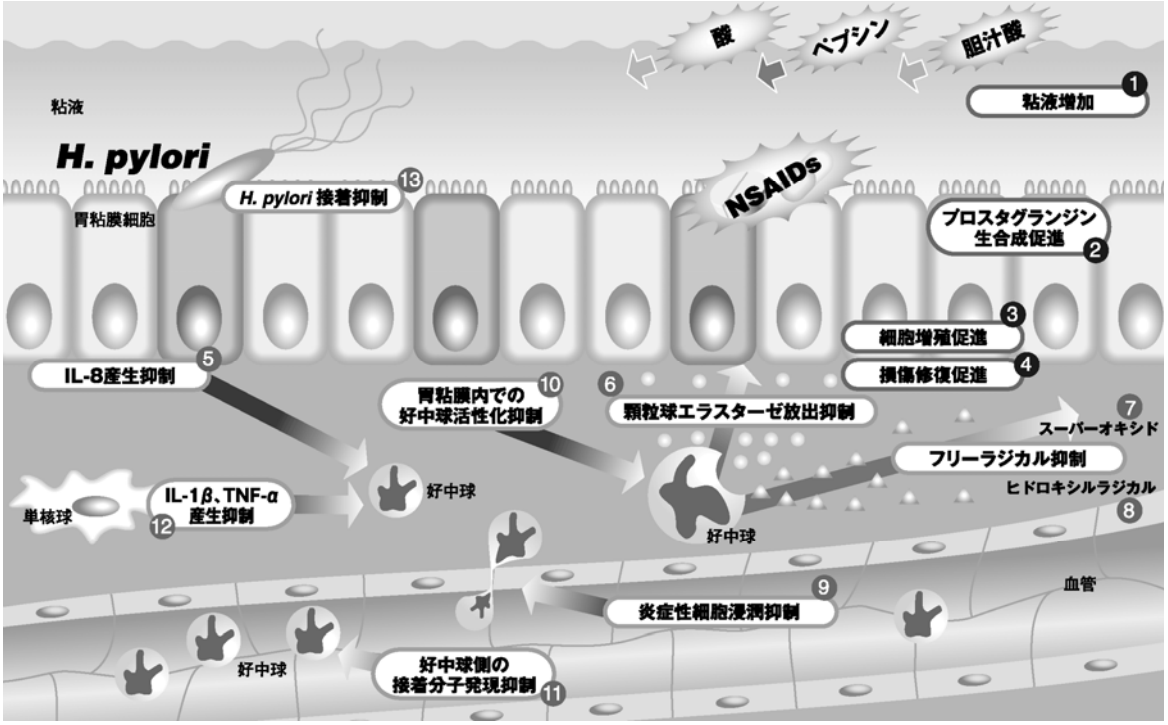


図 1-4　　レバミピドの胃潰瘍及び胃炎に対する作用機序[24)]

第２章　　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルの作製の検討

第１節　　緒言

口腔粘膜炎に対する薬剤スクリーニングの為には、臨床的な口腔粘膜炎に類似した傷害を口腔内に簡便に作製でき、かつ、再現性に優れた動物モデルが要求される。放射線誘発口腔粘膜炎モデルとして、X 線を照射して口腔粘膜炎を誘発するモデルが幾つか知られているが [25)]、障害を引き起こすためには X 線照射装置が必要であり、スクリーニング目的のためには、やや簡便性に欠けている。Keefe らのグループは、Dark Agouti ラットに 5FU, や irinotecan を投与し、小腸等の消化管に粘膜炎を誘発するモデルを開発したが [26, 27)]、抗がん剤に誘発される口腔粘膜炎モデルは知られていない。その他の口腔粘膜炎モデルとして、Slomiany らは、Sprague-Dawley ラットの頬粘膜に氷酢酸を 20 秒間接触させ、口腔粘膜炎モデルを作成している [28)]。このモデルにおいては、氷酢酸と接触直後に粘膜が壊死し、頬粘膜上に潰瘍が形成される。本モデルは、氷酢酸と接触直後から急速に潰瘍は治癒し、10 日以内に完全に回復する短期間の急性口腔粘膜炎モデルである。一方、石山らは、Sprague-Dawley ラットの頬粘膜内に氷酢酸を 50μL 注入することにより、頬粘膜上に口腔粘膜炎を誘発した酢酸誘発口腔粘膜炎モデルを報告している [29)]。本モデルでは、酢酸投与 14 日後まで潰瘍は維持されたが、酢酸を注入した側の頬全体に潰瘍が広がり、さらに粘膜下に深く損傷を及ぼす為、口腔粘膜炎モデルとしては重篤すぎると考えられた。

本章では、薬剤スクリーニングのための口腔粘膜炎動物モデルの作成を目的として、潰瘍作製方法を工夫し、限局性の潰瘍性病変を伴う、より臨床的な口腔粘膜炎に類似した新規口腔粘膜炎モデルの作製を試みた。すなわち、口腔粘膜炎が口腔粘膜に対する物理的な障害によっても誘発されることに着目し、潰瘍作製方法として、ラット頬粘膜にモノポーラーを接触させ、口腔粘膜の一部を焼灼する焼灼法を用いて、より限局性の潰瘍性病変が発症する口腔粘膜炎モデルの作製を試みた。焼灼後の頬組織の傷害を観察することにより、焼灼法を用いたラット口腔粘膜炎モデルの妥当性を評価した。

第２節　　実験材料及び方法

第１項　　実験材料

(1)　実験動物

6 週齢の Specific-pathogen-free グレードの雄 Sprague-Dawley ラットを日本チャールズリバー（大阪、日本）から購入し、実験に使用する前に 1 週間順化した。飼育条件に関しては、照明は 12 時間毎に照明と消灯を行い、水と標準研究用餌（CRF-1、オリエンタル酵母㈱、大阪、日本）を自由摂取とした。なお、ラットは摂水量・摂餌量の測定を行うため、個別で飼育した。

第２項　　実験方法

(1)　ラット口腔内潰瘍の作製方法

焼灼法による口腔内潰瘍性病変の作製は、ラットをチオペンタール（40～70 mg/kg、i.p.）麻酔下で仰向けにし、開胸器を用いて上顎と下顎を開き視野を取りながら行った。左側口腔粘膜の中央部に先端の直径が 4 mm のモノポーラー（株式会社アムコ、東京、日本）を当て、5 秒間、設定出力 10 で焼灼することにより口腔内潰瘍を惹起した。

(2)　口腔内潰瘍の肉眼的及び病理組織学的評価

口腔内潰瘍惹起後（惹起日を Day 0 とする）、Day 1、3、5、7、14、21 にラットをイソフルラン麻酔下にて腹部大動静脈を切断し放血により安楽死させた。口蓋部を正中線にて離断して左側口蓋部を摘出した。潰瘍面を露出させ、デジタルカメラで写真撮影した。潰瘍面積は、面積解析ソフト（WinROOF、三谷商事㈱、福井県、日本）を用いて計測した。

左側口蓋部は写真撮影後、10%中性ホルマリン緩衝液中で固定し、パラフィン包埋後、通常の方法により H&E、PAS、AZAN 染色標本を作製した。潰瘍性病変の深達度は、表 2-1 のスコアに従い分類した [30]。また、炎症性細胞浸潤、粘膜上皮の増生・肥厚、線維の増生、骨格筋の壊死及び再生についてもそれぞれ 5 段階にスコア化した(表 2-1)。

表 2-1　　潰瘍深達度

スコア	潰瘍の深さ
U1-Ⅰ	糜爛
U1-Ⅱ	粘膜下層まで破壊がみられるが固有筋層は保たれている浅い潰瘍
U1-Ⅲ	固有筋層の一部が破壊されているが完全な断裂は免れている比較的深い潰瘍
U1-Ⅳ	固有筋層が完全に断裂した潰瘍又は穿孔性潰瘍

表 2-2　　一般所見

スコア	炎症性細胞浸潤･粘膜上皮の増生肥厚・繊維の増生・骨格筋壊死又は再生
0	正常
1	ごく軽度
2	軽度
3	中程度
4	高度

第３節　　実験結果

第１項　　ラット焼灼口腔内潰瘍モデルの経日的な潰瘍面積変化

口腔内潰瘍作製より、Day 1、3、5、7、14 及び 21 に 5 例ずつ解剖を行い、潰瘍面積を測定した。潰瘍面積はそれぞれ、18.2 ± 1.5 mm^2（Day 1）、18.7 ± 2.1 mm^2（Day 3）、28.4 ± 1.9 mm^2（Day 5）、14.6 ± 1.1 mm^2（Day 7）、8.3 ± 0.7 mm^2（Day 14）、1.7 ± 0.4 mm^2（Day 21）であり、Day 5 をピークとし徐々に縮小したが、Day 14 までは潰瘍は認められた。Day 21 の潰瘍面積は微小であった。ラット焼灼口腔内潰瘍モデルの経日的な潰瘍面積変化を図 2-1 に、焼灼 5 日後のラット口腔内潰瘍部位を図 2-2 に示す。

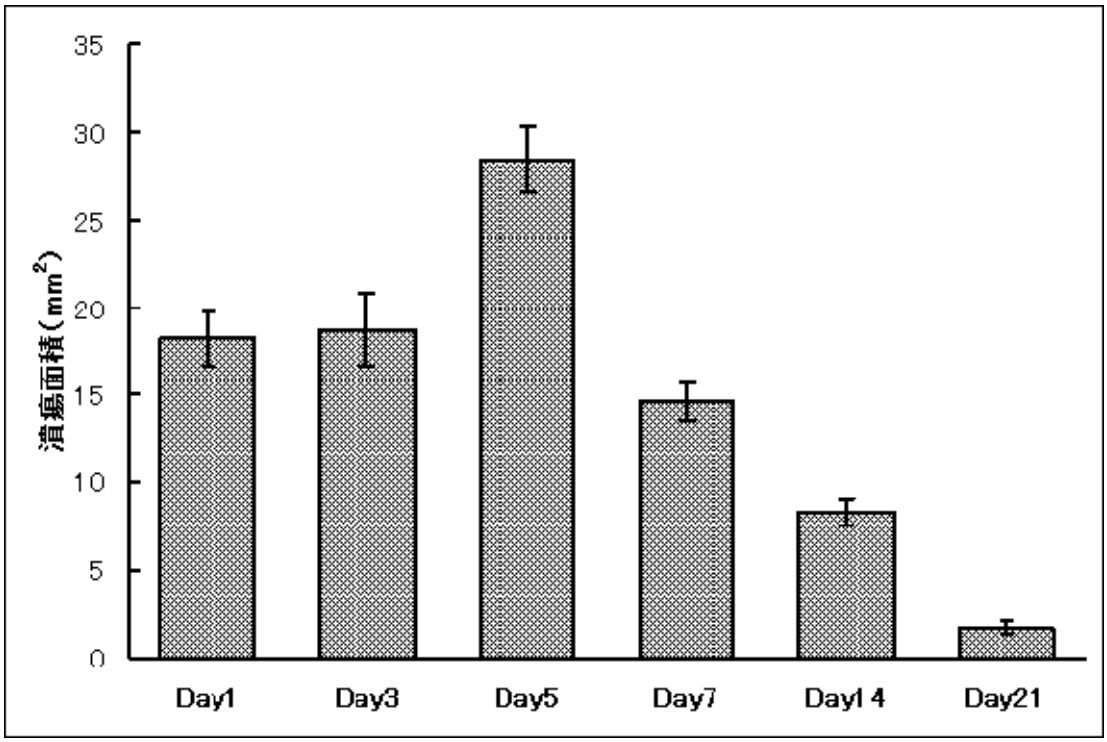


図 2-1　　ラット焼灼口腔内潰瘍モデルにおける経日的な潰瘍面積変化

データは平均値 ± 標準誤差で表した。各群 5 例。

図 2-2　　焼灼５日後のラット口腔内潰瘍部位

第２項　　ラット焼灼口腔内潰瘍モデルの経日的な病理組織学的変化

Day 1、3、5、7、14 及び 21 の潰瘍部位の組織を病理学的に評価した。各日において個体差は認められたものの、各時点での特徴的な変化を以下に記した。

Day 1 では、潰瘍性病変は粘膜下層から筋層まで達していた（Ul-Ⅲ、図 2-3）。病変部位には好中球を主体とする炎症性細胞浸潤が認められ、隣接する粘膜上皮の増生並びに肥厚も軽度に認められた。筋層では炎症性細胞浸潤及び骨格筋の壊死が認められた。

Day 3 では、潰瘍性病変は Day 1 とほぼ同様の所見であった（Ul-Ⅲ）。粘膜下層及び筋層には好中球を主体とする炎症性細胞浸潤が認められた。筋層では骨格筋の壊死が認められるとともに、軽度な膠原線維の増生（以下、線維増生）及び骨格筋の再生が認められた。

Day 5 では、Ul-Ⅳの潰瘍形成が観察された。粘膜下層への炎症性細胞浸潤及び骨格筋の壊死が Day 1、3 と比較して顕著であった。また、病変部位に隣接する粘膜上皮の増生及び肥厚も観察された。筋層の壊死部において、線維増生と骨格筋の再生像が観察された。

Day 7 では、潰瘍性病変は Ul-Ⅲとなった。筋層だけでなく粘膜下層にも線維増生が観察された。筋層の線維増生が明らかとなり、また骨格筋の壊死と再生像も顕著になった。

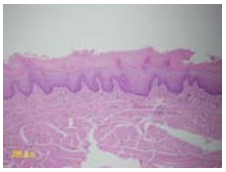
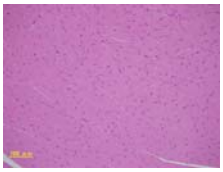
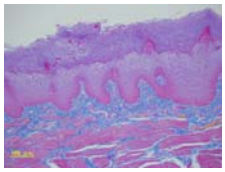
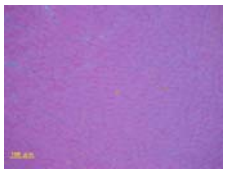
Day 14 では、潰瘍性病変は Ul-Ⅰ又はⅡとなり自然治癒が観察された。粘膜上皮の増生・肥厚、粘膜下層及び筋層の線維増生が観察期間中で最も顕著となった。粘膜下層及び筋層の炎症性細胞浸潤は軽度から中程度となった。

Day 21 では、病変作製部位での潰瘍形成が自然治癒による回復の為、認められなかった（Ul-Ⅰ）。粘膜上皮の増生と肥厚は顕著であったが、炎症性細胞の浸潤、線維増生、骨格筋の再生は軽度であった。骨格筋の壊死は認められなくなった。

H&E染色　　Azan染色

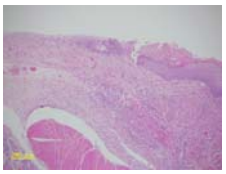
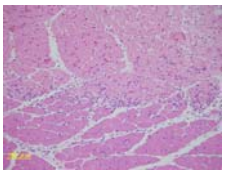
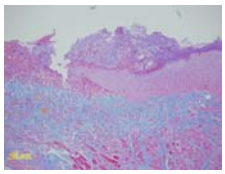
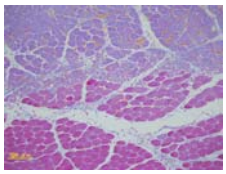
粘膜上皮及び粘膜下層　　骨格筋　　粘膜上皮及び粘膜下層　　骨格筋

正常群

粘膜上皮・下層・筋線維に異常なし（0）　　粘膜下層・骨格筋間の膠原線維量異常なし（0）

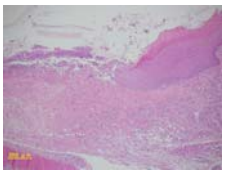
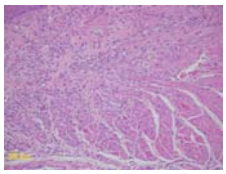
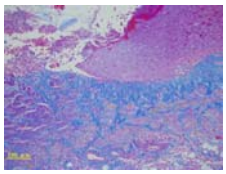
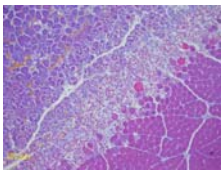
Day 1

潰瘍形成（Ⅲ）、好中球を主体とした炎症性細胞浸潤（4）
骨格筋壊死

粘膜上皮、基底細胞の増生（2）
粘膜下層の膠原線維が疎
骨格筋、膠原線維増生（0）

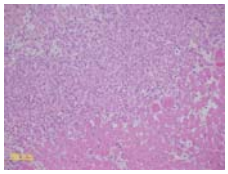
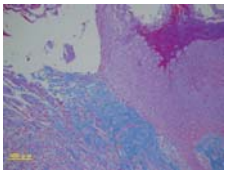
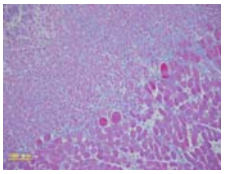
Day 3

潰瘍形成（Ⅲ）、好中球を主体とした炎症性細胞浸潤（4）
骨格筋壊死、壊死域に炎症性細胞浸潤（4）
壊死部の境界部骨格筋再生（1）

粘膜上皮、膠原線維増生。肥厚（2）
骨格筋、壊死巣に膠原線維増生（1）

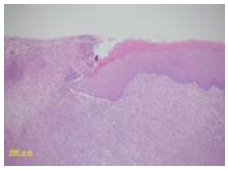
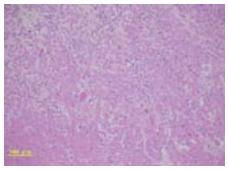
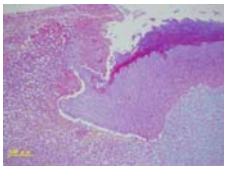
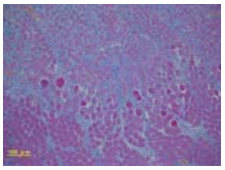
Day 5

高度の潰瘍形成、好中球を主体とした炎症性細胞浸潤（4）
骨格筋壊死、境界部に再生像（4）
壊死領域、炎症性細胞浸潤　（3）

粘膜上皮、膠原線維増生・肥厚（3）
壊死巣に細い軽度膠原線維増生（2）

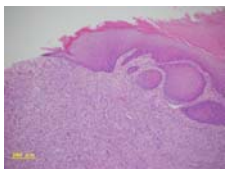
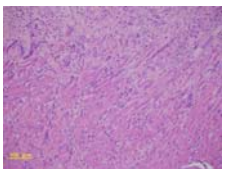
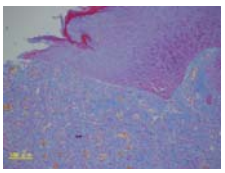
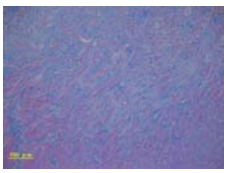
Day 7

高度の潰瘍形成（Ⅳ）、好中球を主体とする炎症性細胞浸潤（4）
骨格筋壊死　境界部に再生像（4）
壊死域に炎症性細胞浸潤（4）

粘膜上皮、膠原線維増生・肥厚（3）
粘膜下層、膠原線維の増生（2）
骨格筋、壊死巣に膠原線維増生（3）

Day 14

潰瘍形成（Ⅲ）、好中球を主体とする炎症性細胞浸潤（3）
骨格筋壊死及び再生像（3）
壊死域に炎症性細胞浸潤（3）

粘膜上皮、膠原線維増生・肥厚（3）
粘膜下層、膠原線維増生（3）
骨格筋、壊死層に膠原線維の増生（4）

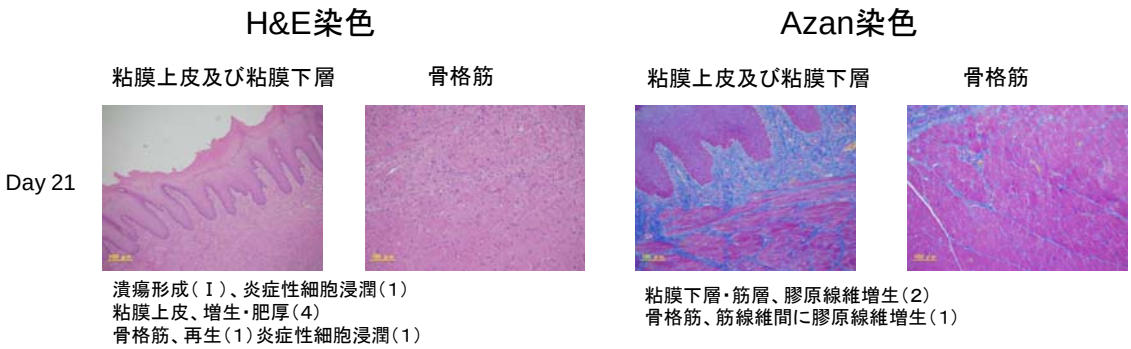


図 2-3　　ラット焼灼口腔内潰瘍における経日的な組織写真（正常群及び Day 1～21）

正常群及び口腔内潰瘍作製後 Day 1～Day 21 までの代表的な潰瘍部位の組織写真（左から表層 H&E 染色、筋層 H&E 染色、表層 Azan 染色、筋層 Azan 染色）を示した。図下に組織学的評価結果（スコア）をコメントした。

第４節　　考察

口腔粘膜炎に対する薬剤スクリーニングのためには、簡便な口腔粘膜炎動物モデルが求められる。簡便な口腔粘膜炎動物モデルとしては、Slomiany らの氷酢酸接触口腔粘膜炎モデルと石山らの氷酢酸注入口腔粘膜炎モデルが報告されている。Slomiany らの氷酢酸接触口腔粘膜炎モデルでは、氷酢酸と接触直後から急速に潰瘍は治癒し、通常飼育を行った場合、接触 3 日後には潰瘍面積が約 1/3 となり、接触 6 日後には潰瘍面積が 1/10 以下に低下し、10 日以内に完全に回復することが報告されている [28)]。石山らの氷酢酸注入口腔粘膜炎モデルでは､酢酸投与 14 日後まで潰瘍は維持されたが、潰瘍面積のピークは酢酸注入 1 日後であり､注入 7 日後には潰瘍面積はピークの約 1/2 に減少することが報告されている [29)]。また、本モデルでは、酢酸を注入した側の頬全体に潰瘍が広がり、さらに粘膜下に深く損傷を及ぼす為、口腔粘膜炎モデルとしては重篤すぎると考えられた。このように両モデルでは口腔粘膜炎誘発直後に潰瘍面積がピークに達し、その後潰瘍面積が急速に減少するが、薬剤の口腔粘膜炎に対する治癒促進効果を評価するためには、評価対象である潰瘍面積が長期間維持できる慢性的な口腔粘膜炎モデルの方が好ましい。また、臨床においては、抗がん剤の投与で投与数日後から 10 日目 [8)]、放射線療法では開始後 1 週間程度で出現する [31)]と言われているが、両モデルでは潰瘍のピークが誘発直後であることから潰瘍発生時期も異なっている。

簡便かつ、より臨床的な口腔粘膜炎に類似したモデルの作成を目的に、ラット頬粘膜にモノポーラーを接触させ、口腔粘膜の一部を焼灼することによりラット口腔内に潰瘍を作製した。このときの潰瘍性病変について経日的な評価を行ったところ、Day 5 で潰瘍面積は最大となり、その後、自然治癒により、潰瘍面積は縮小したが、Day 14 まで潰瘍は確認された。従って、本モデルは、潰瘍誘発から潰瘍面積がピークに達するまで 5 日間を要する点で臨床の口腔粘膜炎の発生過程に類似した口腔粘膜炎モデルであると考えられた。

本モデルでは、潰瘍面積が長期間維持できるため、薬剤の口腔粘膜炎に対する治癒促進効果が潰瘍面積を用いて評価できることが期待される。薬剤の治癒促進作用を評価するためには、潰瘍の悪化が始まる Day 3 から粘膜障害の治癒過程の初期である Day 7 まで薬剤を投与し、薬剤投与群および非投与群の Day 8 の潰瘍面積を比較することで可能になると考えられた。加えて、潰瘍病変は限局的であり、その潰瘍面積は、ばらつきがほとんどなく、均一であった。これらの経時的な傷害は非常に再現性に優れ、潰瘍面積にばらつきが少ないことから、口腔内潰瘍に対する薬剤の潰瘍治癒促進作用の評価スクリーニングとして、使用できると考えられた。

組織学的には、Day 1～3 において粘膜下層及び筋層に炎症性細胞浸潤、骨格筋の壊死を認め、潰瘍がピークに達する Day 5 では、炎症性細胞浸潤、骨格筋の壊死は顕著となった。回復過程では膠原線維の増生と骨格筋の再生を伴い、その後粘膜上皮の増生・肥厚が認められた。口腔粘膜炎の発症は、抗がん剤投与や放射線照射によるイニ

シエーションにより、上皮細胞における転写因子の活性化や炎症性サイトカインの産生があり、潰瘍が発生した後、回復期に移行するとされている[32)]。本モデルにおける組織学的変化は、誘発初期から潰瘍が形成される点が上記の発症過程と異なるが、炎症性細胞浸潤、骨格筋の壊死を伴う潰瘍の悪化やその後の治癒過程は上記の発症過程と類似していた。

これらのことから、本モデルは、口腔内潰瘍に対する薬剤の潰瘍治癒促進作用評価スクリーニングモデルとして、使用できると考えられた。

第５節　　小括

モノポーラーを用い、ラット頬を焼灼することで作製する口腔粘膜炎モデルは、潰瘍面積のばらつきも少なく、簡便で再現性の良いモデルであることが示された。潰瘍惹起から 5 日後に潰瘍は最大となり、徐々に自然治癒が起こることを確認した。組織学的な評価において、潰瘍の悪化に従い、著明な炎症性細胞浸潤、骨格筋の壊死が認められた。誘発初期から潰瘍が形成される点ががん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症過程と異なるが、潰瘍誘発から潰瘍面積がピークに達するまで 5 日間を要することと、潰瘍期から回復期に至る組織学的変化は、粘膜潰瘍における潰瘍～回復過程に類似したモデルであると考えられた。

従って、本モデルは、口腔内潰瘍に対する薬剤の潰瘍治癒促進作用評価スクリーニングとして、使用できると考えられた。潰瘍の悪化が始まる Day 3 から粘膜障害の治癒過程の初期である Day 7 まで薬剤を投与し、その後潰瘍面積を測定することで、薬剤の治癒促進作用が評価できると考えられた。

第３章　　Ｘ線照射によるラット口腔粘膜炎モデル作製の検討

第１節　　緒言

これまで放射線あるいは化学療法剤が引き起こす口腔粘膜炎は、放射線あるいは化学療法剤が粘膜上皮の幹細胞の増殖を障害し、粘膜上に潰瘍が形成されることで発生すると考えられてきた。しかし、最近の研究では、幹細胞のみならず周辺の粘膜上皮細胞においても、がん治療によって発生したフリーラジカルが転写因子や炎症性サイトカインなどのメッセージやシグナルを増幅させて、アポトーシスを誘導する複雑な機序が提唱されている [5, 6]。また、がん治療による好中球減少が免疫力の低下を引き起こすと、口腔内は易感染状態となり、口腔内常在菌による二次的な口腔粘膜炎が発症することも報告されている [3]。このように、放射線あるいは化学療法が引き起こす口腔粘膜炎の発症機序の一部は明らかにされつつあるが、その機序は非常に複雑であり、完全に解明されるまでには至っていない。

がんの治療に伴う口腔粘膜炎は、頻繁に認められる重要な有害事象であるが、未だ有効な予防・治療法が開発されていない。口腔粘膜炎の多くは疼痛を伴い、摂食や嚥下障害などを生じさせる為､がん治療中の患者さんの生活の質を著しく低下させる [1]。特に頭頚部がんに対する化学放射線療法ではほぼ 100％で重篤な口腔粘膜炎が生じ、QOL の低下、がん治療の継続不能が重要な問題となっている [33]。口腔粘膜炎に対する新しい予防・治療法の開発が望まれているが、これを実現する為、口腔粘膜炎の発症機序の解明が急務である。

第 2 章で論述した簡便な焼灼法によるラット口腔粘膜炎モデルは、口腔粘膜炎の治癒促進効果を検討するためには有用と考えられるが、放射線療法における口腔粘膜炎と誘発方法と誘発初期から潰瘍が形成される点において異なる。放射線あるいは化学療法が引き起こす口腔粘膜炎の発症機序は非常に複雑であるため、放射線療法に伴う口腔粘膜炎に対する薬剤の有用性を評価するために、臨床における放射線療法と類似した動物モデルが必要である。

放射線による口腔粘膜炎モデルは、幾つか報告されている [25]。Dorr らは口吻部に X 線を照射して、舌炎を引き起こすマウスモデルを報告し [34, 35]、Sonis らはハムスターの頬袋に X 線を照射することによる口腔粘膜炎モデルを報告している [36-38]。また、ラットにおける放射線による口腔粘膜炎モデルも散見されている [39-41]。しかしながら、口腔粘膜炎発症過程における詳細な遺伝子や組織の経日変化はほとんど報告されていない。また，マウスは口腔が小さいことからハンドリング上問題があり、ハムスターの頬袋は組織学的に血管が少なく、筋層を持たないため，ヒトの口腔粘膜とは異なっている。そこで、放射線照射による新しい口腔粘膜炎動物モデルが望まれていた。

本章では、口腔粘膜炎の予防に着目し、放射線療法における口腔粘膜炎の発症のメカニズムの検討を行うため､高線量の X 線をラットの口吻部のみに単回照射することによって新しい舌炎モデルを作製することとした。舌炎の傷害形成から修復過程に

おける炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現量を経日的に観察した。

第２節　　実験材料及び方法

第１項　　実験材料

(1)　試薬

使用した主な試薬を表 3-1 に示した。

表 3-1　　試薬

試薬名	製造元
イソフルラン（フォーレン®）	アボット・ジャパン㈱（東京、日本）
ペントバルビタール	マイラン製薬 ㈱（東京、日本）
10%中性ホルマリン緩衝液	和光純薬工業㈱（大阪、日本）
生理食塩水	大塚製薬工場㈱（徳島、日本）
RNAlater	Ambion
Palifermin (Kepivance®)	Amgen（カルフォルニア、USA）

(2)　機器

使用した主な機器を表 3-2 に示した。

表 3-2　　使用機器

機器名	型番	製造元
X 線照射装置	CP-160	Faxitron X-ray (USA)
総合血液学解析装置	ADVIA120	バイエルメディカル㈱（東京、日本）
多項目血球学検査装置	XT-2000i / 血球分析装置動物対応ソフトウェア XT-2000iV	シスメックス㈱(兵庫、日本)
遠心分離機	3780	㈱久保田製作所（東京、日本）
Real-Time PCR System	7500 Fast	Applied Biosystems

(3)　動物

6 週齢の Specific-pathogen-free グレードの雄 Sprague-Dawley ラットを日本チャールズリバー（大阪、 日本）から購入し、実験に使用する前に 1 週間順化した。飼育条件に関しては、照明は 12 時間毎に照明と消灯を行い、水と標準研究用餌（CRF-1、オリエンタル酵母㈱、大阪、日本）を自由摂取とした。なお、ラットは摂水量・摂餌量の測定を行うため、個別で飼育した。

第２項　　実験方法

(1)　X線照射

X 線照射は北川らの報告を参考にして実施した[39]。 X 線照射装置は、Faxtron X-ray 社製の CP-160 を使用した。ペントバルビタール 45 mg/kg i.p.にてラットを麻酔し、2 重にした専用鉛版（厚さ 0.5 mm）で口吻部のみ露出するように被覆した（図 3-1）。1 回の照射は 4 匹以下で行い、15 Gy の X 線を照射した。

図 3-1　　放射線照射時の写真

(2)　放射線照射後における遺伝子の経時変化

X 線照射後 1、2、4、6、8 及び 24 時間目に 1 時点につき 4 匹ずつ麻酔し、舌の採取を行った。舌は、摘出後に舌先から 5 mm 程度で切断し、舌先を速やかに RNAlater に浸し、-20℃で保存し、サイトカイン・ケモカイン関連遺伝子発現量の測定を Real-Time PCR 法（ABI7500 Fast, Applied Biosystems）により行った。

(3)　放射線照射後における遺伝子の経日変化

X 線照射群は Day 1、Day 3、Day 5～Day 10、Day 12、Day 14、Day 21 及び Day 28

にそれぞれ 4 匹ずつ、X 線照射を行わなかった正常群は Day 1、Day 7、Day 14、 Day 21 及び Day 28 にそれぞれ 3 匹ずつ舌の採取ならびに採血を行った。

また、Day 0～Day 27 の間、体重測定と摂水量・摂餌量の測定を行った。舌組織は傷害面積の測定、病理組織学的検査及びサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子発現量の測定を Real-Time PCR 法（ABI7500 Fast, Applied Biosystems）により行った。

(4) 傷害面積の測定

安楽死させたラットの口蓋部を正中線にて離断し、舌根部から舌先までを摘出した。採取した舌は平面に並べ、物差しとともにデジタルカメラで写真撮影した。舌の肉眼的な傷害は画像解析ソフトを用いて以下の様にして評価した。舌先から舌背隆起部までを舌表面積（図 3-2，A ; 全体）、舌表面に変色が認められる部位の面積（図 3-2，B : 傷害全体）及び舌表面が鮮やかに赤色化した潰瘍部位の面積（図 3-2，C ; 潰瘍部）をそれぞれ測定した。

写真撮影後、縦中央で切断した舌の左半分を組織学的検討および免疫組織化学的検査に、右半分は遺伝子解析用に RNAlater に浸し、RNA 抽出まで-20°C で保存した。

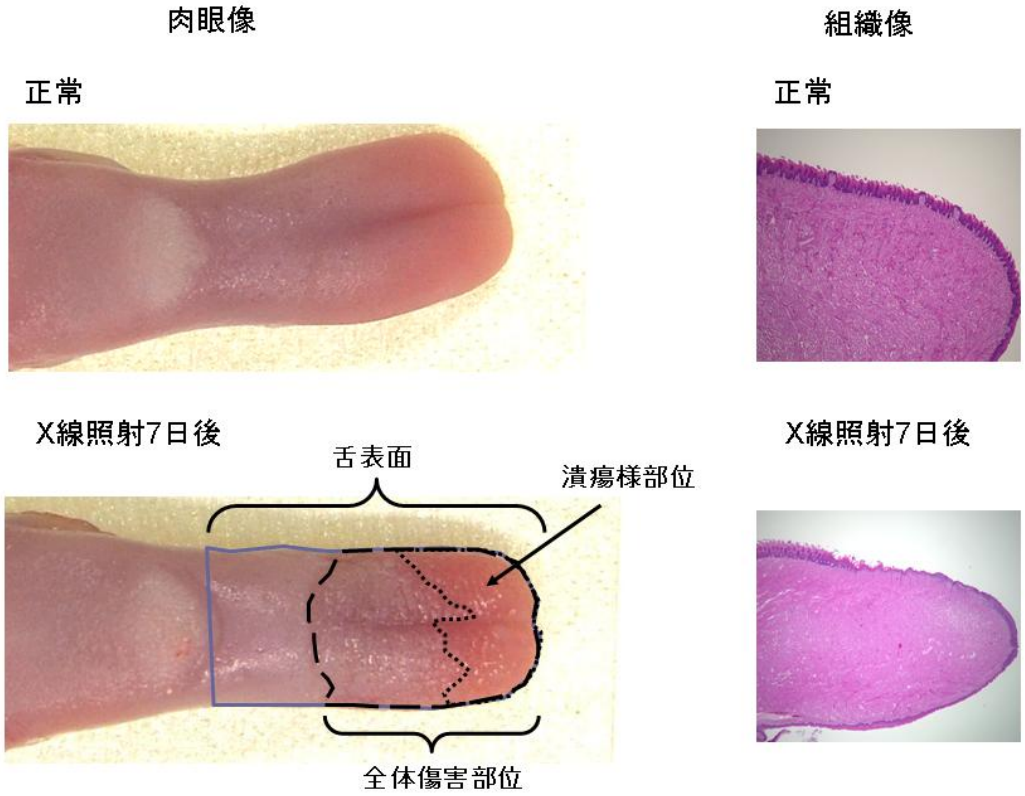


図 3-2　　正常並びに X 線照射後 7 日目のラット舌傷害の写真

(5) 組織学的検討

舌の左半分を 10%中性ホルマリン緩衝液（和光純薬工業㈱大阪、日本）中で固定し、パラフィン包埋後、3 μm に切片を作製し、常法に従い、Hematoxylin & Eosin 染色を行った。

(6) RNAの調製

RNAlater (Ambion)に浸漬した約 100 mg の舌組織を 600 μL の RLT buffer (QIAGEN)とステンレスの金属コーン（Yasui Kikai、大阪、日本）が入っている 3 mL のプラスチックチューブに移した。Multi-beads shocker（Yasui Kikai、大阪、日本）を用いて、製造業者の使用説明書に従い、サンプルを 1900 回転 1 分間自動的に粉砕した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて、粉砕混合液の上清から全 RNA を抽出した。全 RNA の精製度と濃度は分光光度計で確認した。

(7) リアルタイムPCRによる解析

cDNA は MultiScribe Reverse Transcriptase（Applied Biosystems、東京、日本）によって合成され、合成した cDNA を用いて Real-time PCR を Biosystems 7500 Fast Real-time PCR System によって行った。反応混合物は、TaqMan® Gene Expression Primer & Probe (Applied Biosystems)を用いて製造業者のプロトコールに従い、調製した。熱サイクル条件として、95°C 20 秒間処理後、95°C 3 秒間と 60°C 30 秒間の増幅サイクルを 40 回繰り返した。IL6、IL-1β、TNFα、CXCL1 と CCL2 の mNRA の発現は、β-actin mRNA へ標準化し、各遺伝子の相対的な発現量は正常の舌組織に対する平均値の比として ddC 法によって定量化した。

(8) X線照射による舌炎に対するpaliferminの効果

雄ラットに第 3 章第 2 節第 2 項(1)に示した方法に従い、X 線を単回照射することにより、舌炎を惹起させた。palifermin を X 線照射 3 日前に 1 回 10mg/kg、又は、X 線照射 3 日前より 1 日 1 回 3 日間 3mg/kg 皮下投与することにより口内炎予防効果を評価した。

即ち、ベントバルビタールナトリウム 45 mg/kg 腹腔内投与にて、麻酔したラットを口吻部（眼から先の部位）のみ露出するよう専用鉛板（厚さ 0.5 mm） で 2 重に被覆し、X 線照射装置を用いて口吻部に 15 Gy の照射線量を単回照射した。X 線を単回照射した日を開始日（Day 0）と規定した。

照射 4 日前（Day -4）に体重に基いて、層別無作為抽出法により群分けを行った。10 mg/mL の palifermin 溶液と製剤用溶媒（palifermin を除いた溶媒）を覚醒下ラットの皮下に照射 3 日前（Day -3）に 1 回 10 mg/kg 投与した。又は、3 mg/mL の palifermin 溶液と製剤用溶媒（palifermin を除いた溶媒）を覚醒下ラットの皮下に照射 3 日前（Day

-3）から Day -1 まで 3 mg/kg を 1 日 1 回計 3 日間投与した。

X 線照射後 7 日目（Day 7）にラットをイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動静脈切断により放血し、安楽死させた。この後、第 3 章第 2 節第 2 項(4)の項に示した方法に従い、舌を摘出し、デジタルカメラで写真撮影した。面積解析ソフト（WinROOF ver.5.7.2、三谷商事、日本、東京）を用いて、舌表面積(A)、舌表面が白板状化した部位と潰瘍化した部位の総面積（全傷害面積）(B)及び舌表面が潰瘍化した部位の面積（潰瘍様面積）(C)をそれぞれ測定し、舌表面積(A) に対する後者 2 つ(B 及び C) の面積割合を下記のように算出した。順に舌全傷害部 B 面積率、舌潰瘍様傷害部 C 面積率とした。

舌全傷害部 B 面積率%= (B ÷A) x 100

舌潰瘍様傷害部 C 面積率%= (C ÷ A) x 100

(9) 統計解析

データの集計は Microsoft Office Excel 2003（11.6560.6568 SP2）を用いて行い、平均値 ± 標準誤差で表した。有意差検定は SAS 統計ソフトウェア（SAS Institute Japan 株式会社、東京、日本、R9.1）を用いた。

遺伝子発現評価項目に関して、正常群と X 線照射群間の比較は One-way ANOVA、Dunnett's test を行った。P 値が 0.05 未満を有意とした。

Palifermin 薬効評価項目に関して、コントロール群と palifermin 投与群間の比較は、*t* -test を行った。P 値が 0.05 未満を有意とした。

第３節　　実験結果

第１項　　X線照射後の体重の経日変化

正常群の体重は、Day 0 では 210 ± 3.1 g （Mean ± SE, n=15）であったが、Day 27 では 425.3 ± 19.3 g (n=3)となり順調に増加した（図 3-3）。一方、X 線照射群では Day 0（217 ±3 .4 g, n=48）から Day 6（259 ± 6.1g, n=36）までは順調な体重増加が認められたものの、Day 7（251 ± 8.9 g, n=32）からは口腔粘膜炎の悪化に伴って、体重の減少が認められた（図 3-3）。しかし、Day 9（238.2 ± 17.3 g, n=24）以降は、緩やかに増加に転じた。Day 27（369 ± 6.4 g, n=4）においても低値であったが、正常群と同様の増加が確認された。（図 3-3）。

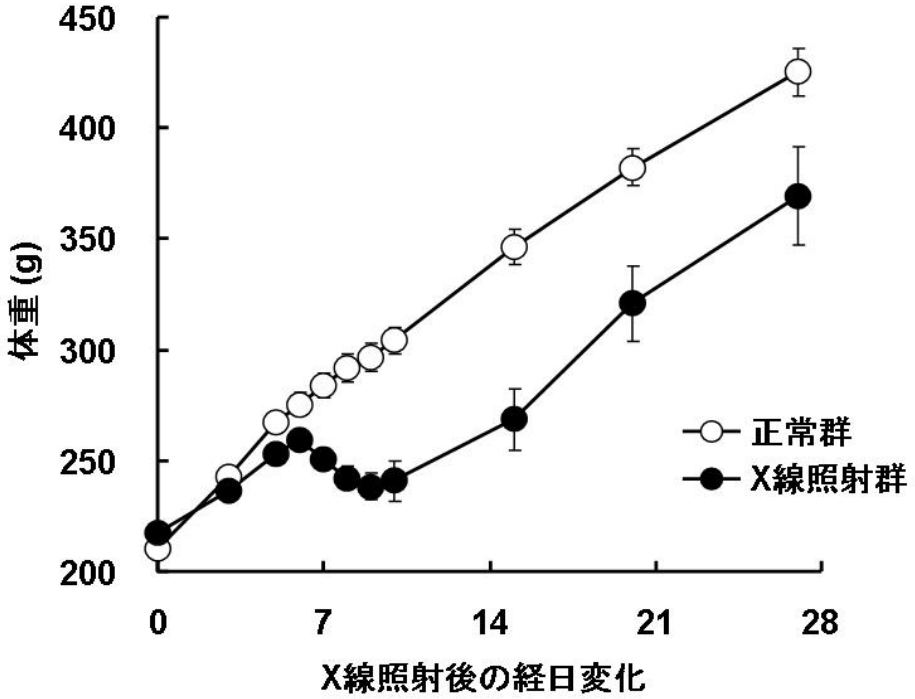


図 3-3　　X 線照射後の体重の経日変化

データは平均値±標準誤差で表した。正常群は、Day 0～1 は 15 例、Day 2～7 は 12 例、Day 8～14 は 9 例、Day 15~21 は 6 例、Day 22~28 は 3 例。X 線照射群は、Day 0～1 は 48 例、Day 2～3 は 44 例、Day 4～5 は 40 例、Day 6 は 36 例、Day 7 は 32 例、Day 8 は 28 例、Day 9 は 24 例、Day 10 は 20 例、 Day 15～21 は 8 例、Day 22~28 は 4 例。

第２項　　摂水量・摂餌量の経日変化

X 線照射群では Day 6 までは正常群と同程度の摂水量・摂餌量が認められたが、口腔粘膜炎の悪化に伴い Day 7 より両摂取量の減少が認められた（図 3-4）。しかしながら、Day 21 以降は正常群とほぼ同程度の摂水量と摂餌量が認められた（図 3-4）。

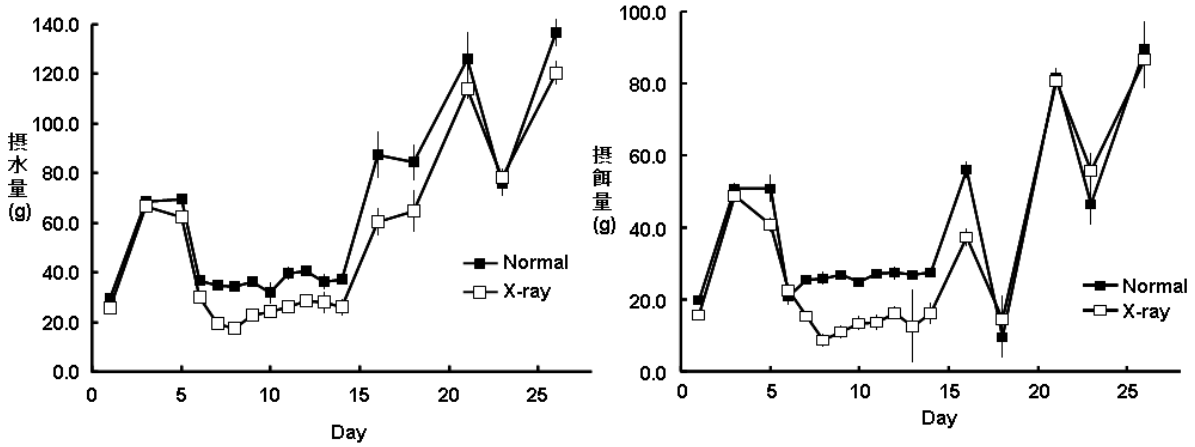


図 3-4　　X 線照射後の摂水量と摂餌量の経日変化

データは平均値±標準誤差で表した。正常群は、Day 0～1 は 15 例、Day 2～7 は 12 例、Day 8～14 は 9 例、Day 15~21 は 6 例、Day 22~28 は 3 例。X 線照射群は、Day 0～1 は 48 例、Day 2～3 は 44 例、Day 4～5 は 40 例、Day6 は 36 例、Day 7 は 32 例、Day 8 は 28 例、Day 9 は 24 例、Day 10 は 20 例、Day 11～12 は 16 例、Day 13～14 は 12 例、Day 15～21 は 8 例、Day 22~28 は 4 例。

第３項　　舌の傷害面積の経日変化

X 線照射に伴う舌傷害は Day 5 から見られ、Day 7（59.1 ± 3.3 mm^2, n=4）にピークに達して、その後徐々に縮小し、Day 28 での肉眼所見では傷害は観察されなくなっていた（図 3-5）。潰瘍は Day 7（27.0 ± 2.7 mm^2, n=4）から見られ、その日をピークとし徐々に縮小し、Day 21 では肉眼的に潰瘍は見られなくなっていた。なお、頬組織については病変の範囲が非常に小さく、病変面積を測定することはできなかった。

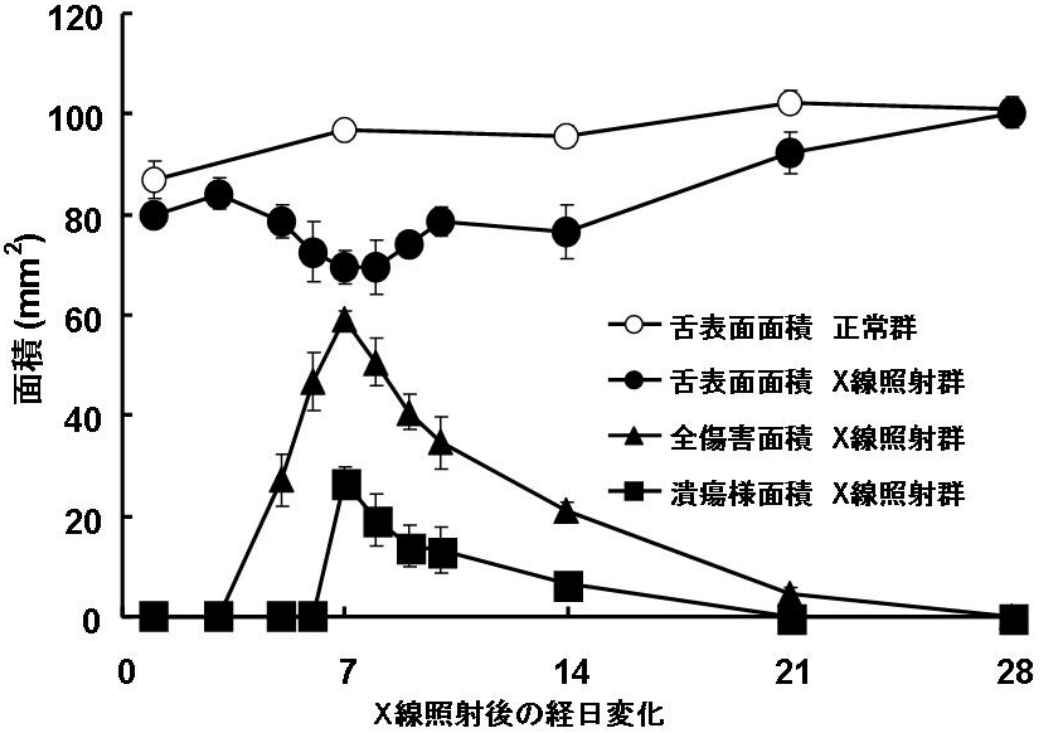


図 3-5　　X 線照射後の舌の傷害面積の経日変化

データは平均値 ± 標準誤差で表した。例数は、正常群が各 3 例、X 線照射群が各 4 例。
正常群では舌傷害は観察されなかった。

第４項　　舌の病理組織学的所見の経日変化

X 線照射により、舌の傷害を病理組織学的に検討し、潰瘍の深達度並びに炎症性細胞の浸潤等の組織学的変化を観察するため、Hematoxylin & Eosin 染色を行い、それぞれの項目についてスコア化し表 3-3 にまとめた。

X 線照射群では、Day 1 より非常に軽度な粘膜上皮の基底細胞の消失、棘細胞の変性・壊死が認められた。また、上皮細胞の退行性変化が生じている事が確認された。

Day 3 から Day 6 においては、異形を示す棘細胞が観察された。また、Day 5 以降において糜爛が確認された。

Day 7～9 にかけて、潰瘍性病変が確認され、潰瘍底に軽度な好中球主体の炎症性細胞浸潤並びに肉芽組織の増生が観察された。また、潰瘍辺縁においては粘膜上皮の肥厚や基底細胞の再生像が観察された。

Day 10～Day 14 にかけて、潰瘍性病変の明らかな軽減傾向がみられ（潰瘍病変なし、あるいは潰瘍病変スコア：2～3）、潰瘍底には軽度な線維化が認められるものもあった。

Day 21 および Day 28 では、異常は認められず、治癒が観察された。

なお、正常群では、何れの観察時点においても、異常所見は認められなかった。

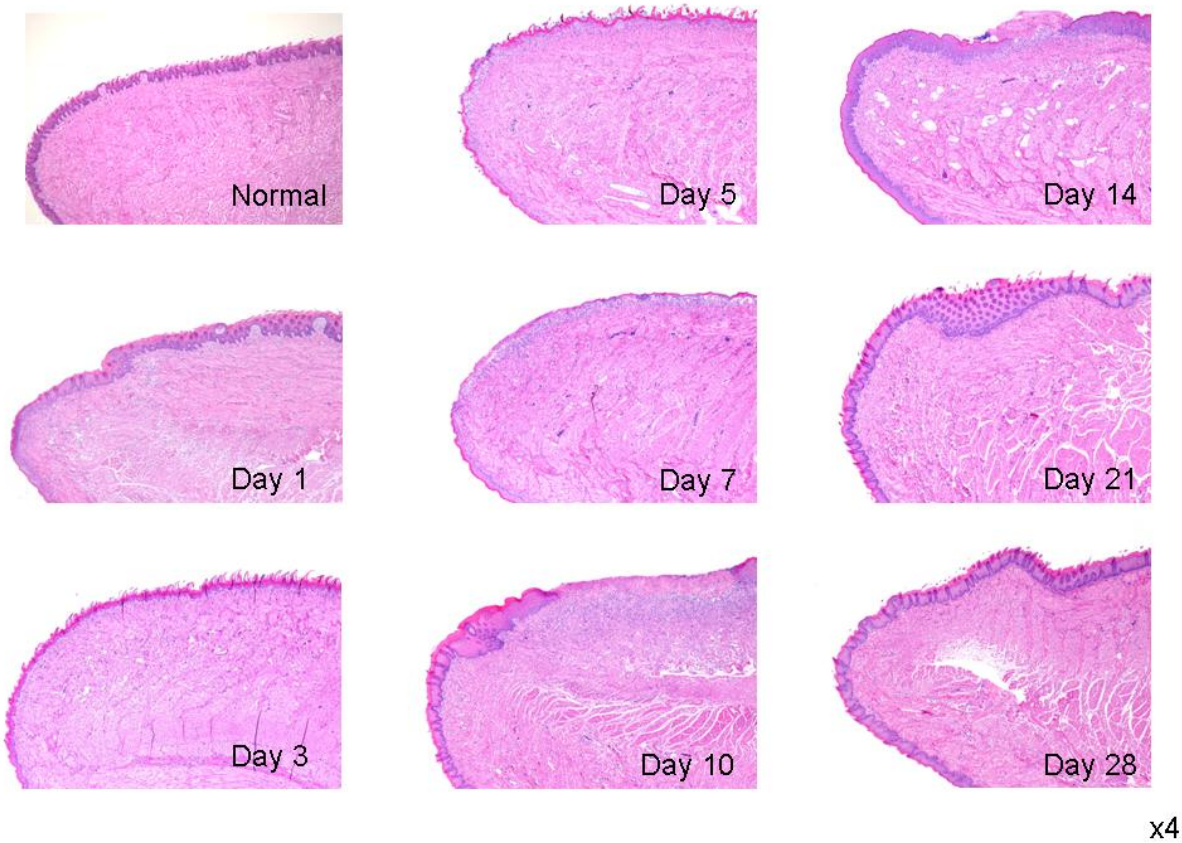
表 3-3　　舌組織の病理組織学的所見の経日変化（スコア）

Day	1	3	5	6	7	8	9	10	12	14	21	28
一般所見［H.E.、AZAN］												
潰瘍性病変	0	1	1	1	3	3	4	2	2	2	0	0
同、深達度	0	1	1	1	4	3	4	3	3	3	0	0
■粘膜上皮の変化												
基底細胞消失	0	3	3	3	4	3	3	2	2	2	0	0
棘細胞の退行性変化	0	2	3	3	4	3	3	2	2	2	0	0
異形棘細胞の出現	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
■潰瘍辺縁の変化												
粘膜上皮肥厚	0	0	0	0	2	1	2	2	1	2	0	0
基底細胞の再生	0	0	0	0	2	2	2	3	2	2	0	0
■粘膜上皮直下の変化												
水腫性変化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
炎症性細胞浸潤（好中球）	0	0	0	1	2	2	1	1	0	1	0	0
炎症性細胞浸潤（リンパ球）	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
肉芽組織増生	0	0	0	0	1	1	2	1	1	2	0	0
線維化	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0

［潰瘍性病変］　0：異常なし、　1：粘膜上皮の退行性変化あるいは糜爛、　2：限局的かつ軽微な潰瘍、　3：中等度の潰瘍、　4：高度な潰瘍

［潰瘍深達度］　0：異常なし、　1：粘膜上皮細胞の変性のみ、　2：糜爛、　3：浅い潰瘍、　4：深い潰瘍
棘細胞の変性・壊死の激しいものは“糜爛”とした。

［その他の所見］　0：異常なし、　1：ごく軽度、　2：軽度、　3：中程度、　4：高度



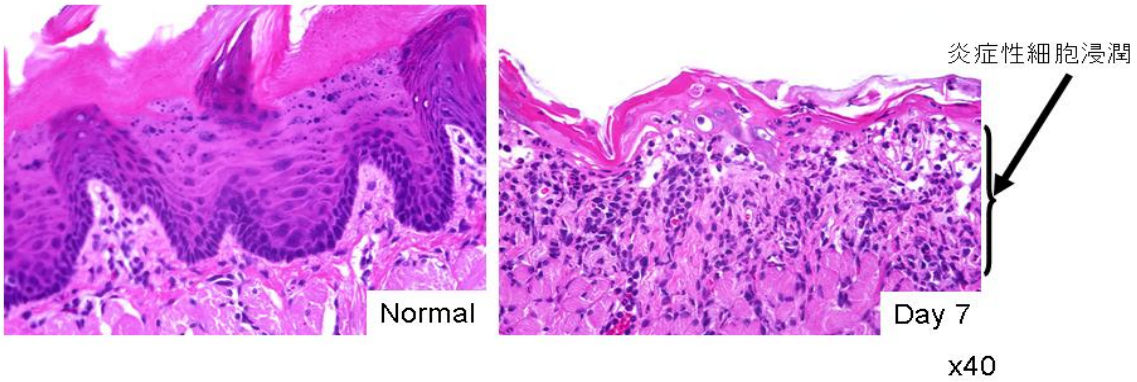


図 3-6　　X 線照射後の経日的舌炎組織学的写真（代表例）

第５項　IL-6、 IL-1β、 TNFα、 CXCL1 及びCCL2 の遺伝子発現量の経日変化及び経時変化

口内炎発症過程における詳細な遺伝子の変化については、ほとんど報告されていない。そこで、発症機序の解明の一端をつかむため、舌炎の傷害形成過程から修復過程における炎症性サイトカイン・ケモカインの遺伝子の発現量を定量した。

舌炎の X 線を照射していない正常群では、測定したサイトカイン及びケモカインの遺伝子発現量に変動は見られなかった。一方、X線照射群では、何れの遺伝子発現量も Day 6 にかけて徐々に増加し、Day 7 において、IL-6 は 950 倍、IL-1β は 330 倍、TNFα は 10 倍、CXCL1 は 200 倍、CCL2 は 12 倍の著しい上昇が確認された。その後、IL-1β、TNFα、CXCL1 と CCL2 は徐々に減少し、IL-6 発現量は、Day 8 に急激な低下を示した。X 線照射の 28 日後には、肉眼で見える舌損傷が消失するとともに、サイトカイン・ケモカインの遺伝子発現量も緩やかに低下した（図 3-7）。

次に、X 線照射直後（イニシエーション期）における遺伝子発現量の変化を評価するために、X 線照射 1 時間後から 24 時間後までグラフに示す各ポイントにおける発現量を測定した（図 3-8）。IL-6 の発現量は、X 線照射後徐々に増加して、照射後 4 時間でピークに達し、正常の 30 倍となった。これとは対照的に、他のサイトカインとケモカインの発現量は、照射の 1～2 時間後にピークとなった。

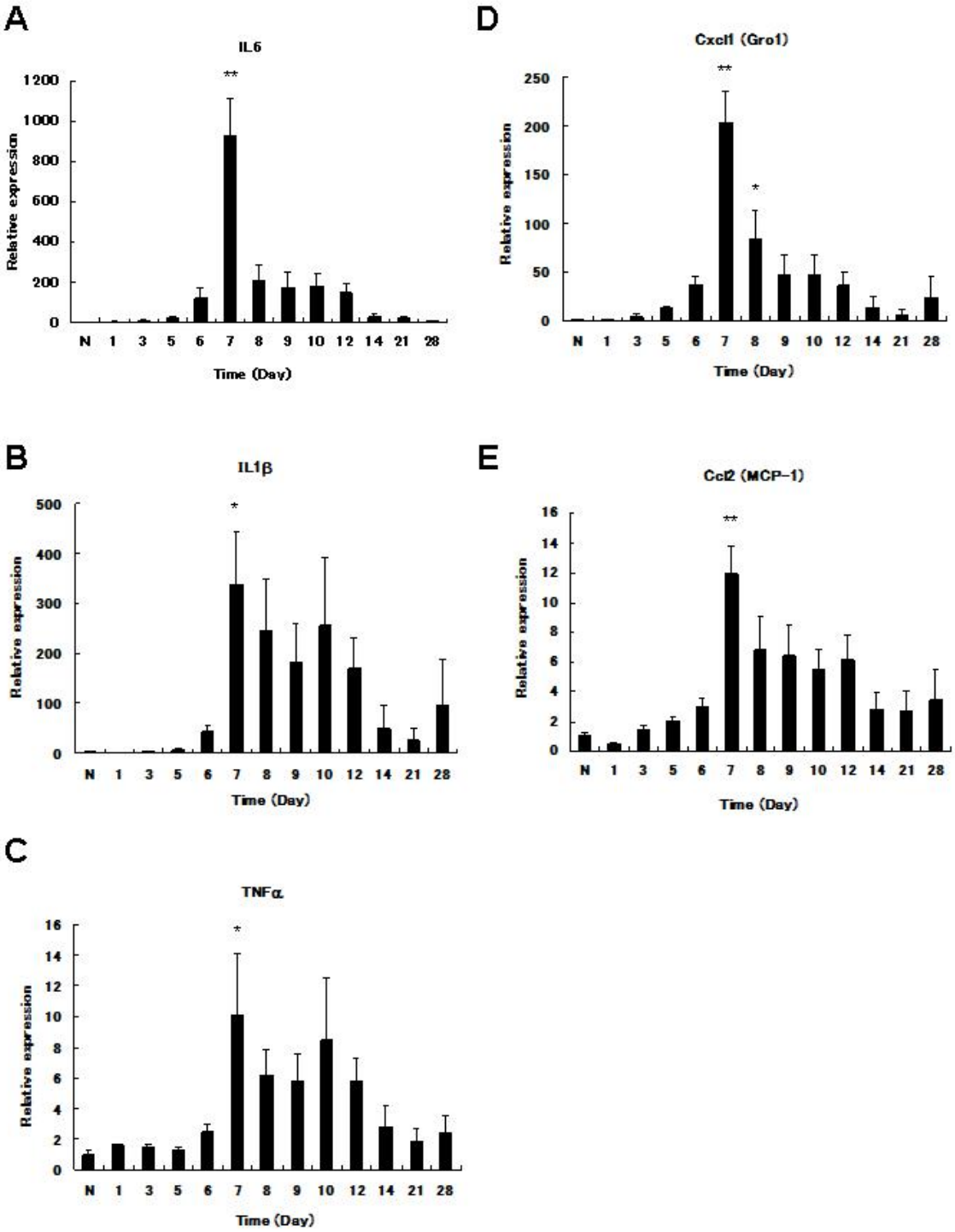


図 3-7　　IL-6 (A), IL-1β (B), TNFα (C), CXCL1 (Gro1) (D) および CCL2 (MCP-1) (E) の遺伝子発現量の経日変化

データは平均値 ± 標準誤差で表した。例数は X 線照射群が各 4 例、正常群（N）は 3 例。
*P , 0.05, **P , 0.01 versus 正常群 (one-way ANOVA, Dunnett's test).

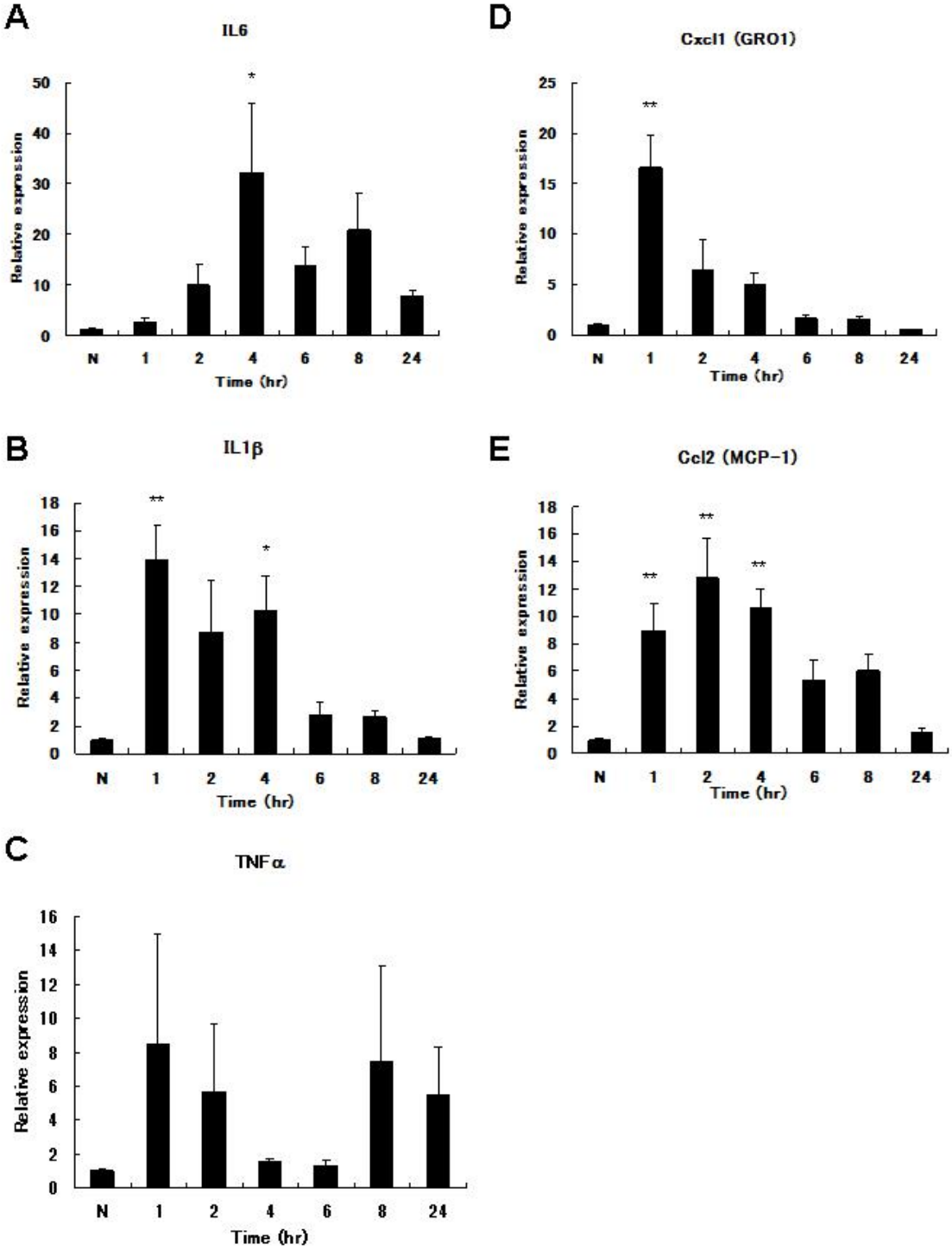


図 3-8　　L-6 (A), IL-1β (B), TNFα (C), CXCL1 (Gro1) (D) および CCL2 (MCP-1) (E) の遺伝子発現量の経時変化

データは平均値 ± 標準誤差で表した。例数は X 線照射群が各 4 例、正常群（N）は 3 例。
*P , 0.05, **P , 0.01 versus 正常群 (one-wayANOVA, Dunnett's test).

第６項　　X線照射による舌炎に対するPaliferminの効果

Palifermin は、血液悪性腫瘍患者の高用量の化学放射線療法における重度の口腔粘膜炎の発症予防薬として、アメリカで承認されている薬剤である。近年では、頭頸部がんにおける化学放射線療法を受けている患者さんを対象とした、２つのプラセボ対象臨床試験において、palifermin が有効であることが示されている[42, 43]。

そこで、我々が作製した X 線照射による舌炎モデルにおいて、臨床使用されている palifermin の有効性について検討を行った。X 線照射 3 日前（Day -3）に 1 回、palifermin 10mg/kg の皮下投与では、全傷害部位面積並びに潰瘍様部位面積は有意に抑制されなかった（図 3-9）。次に palifermin 3mg/kg を X 線照射 3 日前（Day -3）より 1 日 1 回 3 日間皮下投与行ったところ、全傷害部位面積を 81.9%まで抑制し、さらには、潰瘍様部位においては 100%の抑制を示し、有意な障害面積抑制効果が得られた（図 3-9）。

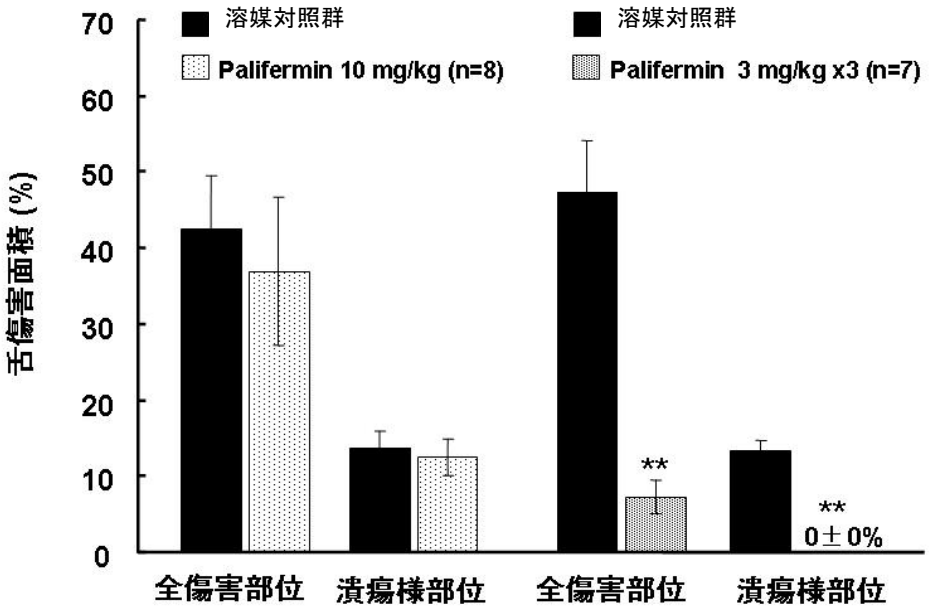


図 3-9　　X 線照射による舌炎に対する palifermin の効果

データは平均値 ± 標準誤差で表した。

*P , 0.05, **P , 0.01 versus 溶媒対照群(*t*-test)。

第４節　　考察

本章では、X 線（15 Gy）ラットの口吻部に単回照射することにより、口腔粘膜炎を惹起し、惹起された口腔粘膜炎の経日的な病変について評価を行った。

既報の X 線誘発ラットモデルの検討では、麻酔したラットを円錐状の鉛で覆い、粘着テープを用い、舌を鉛の外へ固定し、放射線を照射することにより舌炎を誘発していた[41)]。この方法は、定量的で再現可能な舌炎を引き起こすことが可能であると考えられるが、舌を粘着テープで固定することで、放射線による舌炎以外にも人為的に舌の損傷が起こる可能性が危惧された。また、X 線照射の暴露量として 30 Gy は非常に高い線量であると考えられる。そこで、我々は、舌に直接接触することなく、非侵襲的かつ定量化可能な舌炎を誘発する試みを行った。

当初、予備検討において、遮蔽 BOX にラットを入れ、左頬に放射線を照射したが、重篤な放射線傷害が観察された。これは、広範囲に放射線が暴露されたからであると考えられた。このため、遮蔽方法を改良し、ラットの口吻部のみ露出するように専用鉛板（厚さ 0.5 mm を 2 重）で被覆し、X 線照射暴露量並びに暴露部位について多くの予備検討を行った結果、口吻部に 15 Gy の X 線を単回照射により、局所に放射線を暴露することができた。そこで、本方法を用い、放射線照射による口腔粘膜炎を作製し、経日的な病変について評価を行った。

体重の変化は、Day 5 まで観察されなかったが、Day 7 において、舌の潰瘍性病変の出現とともに、摂餌量及び摂水量が減少し（図 3-4）、体重減少が観察された（図 3-3）。その後、潰瘍性病変の回復に伴って体重は回復し、Day 9 以降は正常群と同様の速度で体重の増加が見られた。舌炎の発生の研究において、X 線照射数日後に舌炎が誘発されることは報告されているが[41, 44, 45)]、本モデルにおいては、摂食・摂水困難に伴う体重減少が認められた。また、人におけるがん化学放射線療法においても CTCAE Ver3.0 分類（表 1-1）におけるグレード 3（融合した潰瘍または偽膜：わずかな外傷で出血/症状があり、十分な栄養や水分の経口摂取ができない）以上に相当する重症の口内炎の発生率が高く、十分な栄養が摂取できない患者が多く認められることから、本モデルにおける摂食困難と思われる体重減少は人の病態と相関していた。

舌の傷害については、Day 5 より糜爛状の傷害が観察され、Day 7 において舌に潰瘍が観察された。舌の傷害及び潰瘍様面積は Day 7 をピークにして、その後、徐々に縮小し、Day 28 においては、肉眼で観察することが困難となった（図 3-5）。

さらに、組織学的検討では、Day 1 で基底細胞の細胞増殖が停止し、引き続き棘細胞の変性・壊死が生じ、Day 5 以降において糜爛や潰瘍に進展することが示された。これらの潰瘍性病変は Day 7～9 でピークになり、その後徐々に減少し、Day 21 以降で正常値に戻った（表 3-3）。類似の結果は、X 線照射による皮膚損傷モデルにおいても報告されている[46)]。これら、肉眼的または組織学的検討の結果から、薬剤効果の評価を行うには、潰瘍が出現する X 線照射後 7 日目に行うのが最適であると考えられた。

放射線により誘発される粘膜炎は、5 段階のプロセス：①開始期、②シグナル伝達期、③シグナル増幅期、④潰瘍期、⑤治癒期をたどると提唱されている（図 1-2）[5, 6]。①開始期においては、放射線照射等による活性酸素種やフリーラジカルが生じ、DNA が損傷されると考えられている。②シグナル伝達期／③シグナル増幅期においては、損傷した DNA により、転写制御因子が活性化され、シグナル分子が増殖されることにより、炎症性サイトカインとケモカインが産生されると報告されている[47]。そこで、X 線照射の後の炎症性サイトカインとケモカインの遺伝子発現について、経日的並びに経時的検討を行った。その結果、X 線照射の後、肉眼的損傷が出現する前に炎症性サイトカイン（IL-6、IL-1β と TNFα）とケモカイン（CXCL1 と CCL2）が増加し、1～4 時間以内にピークに達した（図 3-8）。このことから、サイトカインとケモカインの一過性の上昇を抑制することが出来れば、放射線療法によって誘発された口腔粘膜炎を防止できる可能性があると考えられた。次に、発現量の経日的観察において、炎症性サイトカインとケモカインの発現量は、Day 1 から Day 6 にかけて徐々に増加していき、Day 7 において急激な増加傾向を示した（図 3-7）。病理組織学的検討において、Day 7 において急激な炎症性細胞の浸潤が傷害部位に認められることから、これらサイトカイン・ケモカインの産生は浸潤した炎症性細胞由来と考えられた。IL-6 と CXCL1 については Day 8 で急激な低下を示したものの、その後は Day 28 まで緩やかな低下傾向を示した。IL-1β、TNFα及び CCL2 は Day 7 のピークの後、徐々に低下していく傾向にあった。これらの変化は Day 8 以降における病理組織学的検討による潰瘍または傷害の治癒過程と相関しており、傷害病変の強さを反映しているものと思われた。がん患者における放射線療法あるいは放射線化学療法に伴う口腔粘膜炎の発症機序には炎症性サイトカイン・ケモカインが深く関与していることが報告されており[47]，我々の作製したモデルはそれに類似していた。尚、これらサイトカイン・ケモカインの低下のパターンの違いについては、今後の詳細な検討が必要と考えられた。

Palifermin は、臨床において、がん放射線化学療法により誘発される口内炎を抑制することが報告されている[42, 43]。さらに、ヒト KGF とラット KGF（DNA の 89.4%とタンパク質濃度の 90.2%）は、非常に類似している。そこで、本研究で新規に作製した X 線誘発ラット舌炎モデルの有用性を確認する為、臨床で有用性が確認されている palifermin を用いて本モデルの検証を行った。その結果、palifermin（3mg/kg）を X 線照射 3 日前より 1 日 1 回 3 日間皮下投与することにより、傷害面積は顕著に抑制し、さらに潰瘍様部位においては完全に抑制した。しかし、X 線照射 3 日前 1 回のみ palifermin（10mg/kg）を皮下投与した場合では、傷害面積の有意な抑制は認められなかった。3 日前 10mg/kg 1 回のみ投与で有意な効果が認められなかった理由は明確でないが、KGF の 3 回以上の連日投与は上皮の厚さを劇的に増大させ、放射線による細胞障害において放射線誘発細胞毒性に対する保護作用示した報告と上記結果は一致する[48]。臨床で有効性が示されている口内炎予防薬が、本研究における X 線誘発新規舌炎モデルに対し奏功したことは、新規薬剤を評価するうえで、本モデルの有用性が示唆されたのではないかと考えられた。

第５節　　小括

本章では、高線量の X 線をラットの口吻部のみに単回照射することによって新しい舌炎モデルを作製した。口腔粘膜炎の経時変化を観察したところ，照射 5 日目から舌に傷害が起き，7 日目の舌に潰瘍様の傷害も観察され，ヒトの放射線照射による口腔粘膜炎に類似した症状が観察された。また，体重の経時的推移に関しても，粘膜傷害と相関のある変動が観察された。

がん患者における放射線療法あるいは化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症機序には、炎症性サイトカイン・ケモカインが深く関与していることが報告されているが、本章における X 線誘発ラット舌炎モデルにおいて X 線照射 1～4 時間と 7 日目に炎症性サイトカイン・ケモカインの発現量が急激に増加することが分かった。炎症性サイトカイン・ケモカインの経日的な発現変化は、舌炎の傷害形成から修復過程における舌傷害の重症度の変化の推移と一致した。臨床で有効性が示されている palifermin の 3 日間投与により、傷害面積と潰瘍様面積が抑制されたことから、本モデルの有用性が検証された。従って、本モデルは、がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症メカニズムの解明や今後の新しい治療法の評価に有用であると考えられた。

第４章　ラット口腔粘膜炎モデルに対して有効なレバミピド液剤の開発

第１節　緒言

がんの治療に伴う口腔粘膜炎は、頻繁に認められる重大な有害事象である。しかしながら、未だ有効な予防・治療法が開発されていないため、口腔粘膜炎に対する新しい予防・治療法の開発が望まれている。

レバミピド（化学名：(±)-2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl] propionic acid）は大塚製薬株式会社で合成されたキノリノン誘導体である[12)]。レバミピドは胃潰瘍及び胃炎の胃粘膜病変の改善薬として日本及びアジア各国で販売されている。また、レバミピドのマイクロ粒子の懸濁液がドライアイの治療薬として日本で販売されている（図 1-3）。

レバミピドの主な薬理作用として、胃粘膜の内因性プロスタグランジン増加作用[13-15)]、及び、胃粘膜傷害の発症因子の 1 つであるフリーラジカル抑制作用[16-19)]が報告されている。また、本薬には好中球活性化の抑制作用[49-52)]、単核球や胃粘膜、血管内皮細胞からの炎症性サイトカイン産生抑制作用[53-56)]等、種々の炎症抑制的な作用を有することが明らかになっている[57)]。In vitro において、これらの作用を得るためには 10^{-6} M（0.37 μg/g tissue）～10^{-4} M（37 μg/g tissue）の濃度が必要とされているが[13, 16)]、レバミピド 100～300 mg 経口投与時、胃粘膜に高濃度分布（投与 1 時間又は 2 時間後に 10^{-4} M 以上）するため[58)]、胃炎・胃潰瘍に対するレバミピドの直接作用が示唆されている[59)]。

レバミピドの口腔粘膜炎に対する効果も検討されてきており、放射線療法前にレバミピドを含む含嗽液で含嗽することにより、放射線療法による口腔粘膜炎の予防に効果があることが臨床のパイロット試験において報告されている[20-23)]。レバミピドを含む含嗽液は、レバミピド錠剤をアルコックス（ポリエチレンオキサイド）とイナゲルの混合溶液に懸濁した例[20-22)]や、レバミピド錠剤を水[23)]あるいはカルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁した例が報告されているが、いずれも低濃度（0.1 %または 0.2%）製剤が使用されている。

胃炎・胃潰瘍に対するレバミピドの効果は直接的に分布する胃粘膜中での濃度が重要であることが示唆されていることから、レバミピドの口腔粘膜炎に対する治療・予防効果に対しても、レバミピドの口腔粘膜内への直接的な分布が重要であると仮定できる。しかしながら、レバミピドの口腔内への直接的な分布に影響するかもしれない製剤中のレバミピド濃度、レバミピド製剤中の粒子径、粘性、添加剤および投与方法等に関する詳細な評価は未だ行われていない。

そこで、本研究では、レバミピドの口腔内への直接的な分布に影響するかもしれないレバミピド粒子の微細化、口腔内への滞留性の向上、製剤中レバミピドの高濃度化等を、焼灼法によるラット口腔内潰瘍モデルの口腔粘膜炎治癒促進効果を指標に評価

することにより、口腔粘膜炎に対してより高い治癒促進効果を有するレバミピド液剤の開発を試みた。また、臨床に近似した薬効モデルとして、X 線をラットの口吻部のみに単回照射することによって作成した放射線誘発舌炎モデルを用いて、放射線障害で誘発された口腔粘膜炎に対する最適化したレバミピド液剤の予防･治癒効果の評価について検討した。

第２節　　実験材料及び方法

第１項　　実験材料

(1)　試薬

使用した主な試薬を表 4-1 に示した。

表　4-1　　試薬

試薬名	製造元
レバミピド	大塚製薬（株）（東京、日本）
ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）	信越化学工業（株）（東京、日本）
ポリビニルピロリドン（PVP）	ＢＡＳＦ（Land Rheinland-Pfalz、ドイツ）
ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）	日本曹達（株）（東京、日本）
プルラン	（株）林原（岡山、日本）
カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMCNa）	和光純薬工業（株）（大阪、日本）
Ｄ－ソルビトール	和光純薬工業（株）（大阪、日本）
ステビア	守田化学工業（大阪、日本）
パラオキシ安息香酸メチル	和光純薬工業（株）（大阪、日本）
ストロベリー香料	三栄源エフ・エフ・アイ（大阪、日本）
塩酸	和光純薬工業（株）（大阪、日本）
水酸化ナトリウム	和光純薬工業（株）（大阪、日本）

(2)　機器

使用した主な機器を表 4-2 に示した。

表　4-2　　使用機器

機器名	型番	製造元
回転式ホモジナイザー	ロボミックス	プライミクス（株）（大阪、日本）
超高速液/液せん断式ホモジナイザー	クレアミックス W モーション	エム・テクニック（株）（大阪、日本）
透析装置	ペリコン 2 ミニ	メルクミリポア（マサチューセッツ、米国）
回転粘度計	RC-100A	東機産業（株）（東京、日本）
レーザー回折粒度分布測定装置	SALD-3000J	島津製作所（株）（京都、日本）
X 線照射装置	CP-160	Faxitron X-ray（イリノイ、 USA）

(3)　動物

ラットは、雄の Crl:CD(SD)Sprague-Dawley（SPF グレード、日本チャールズリバー、

日野、日本）を使用した。飼育条件に関しては、温度は 23 ± 2°C、湿度は 60 ± 10%、照明は 12 時間毎に照明と消灯を行った。餌は CRF-1（オリエンタル酵母、東京、日本）を、水は水道水を自由摂取とした。

第２項　　実験方法

(1)　レバミピド液剤の調製

レバミピド液剤の調製方法の概略を図 4-1 に示す。1L スケールの 2 種の分散剤（HPMC 又は PVP）を用いたレバミピドサブミクロン懸濁液の調製は、以下のように行った[60]。尚、組成量は、調製スケールに従い比例計算で増減し、調整した。

所定量の分散剤を 200g の精製水に溶解し、濃塩酸 14.2g を加え、さらに精製水を加えて、275g の分散剤－塩酸水溶液を調製した。一方、水酸化ナトリウム 4.4g を 650g の精製水に加えて調製した水酸化ナトリウム水溶液に、レバミピド 20g を加温溶解し、さらに精製水を加え、全量を 735g の水酸化ナトリウム－レバミピド溶液を調製した。なお、分散剤量はレバミピドと分散剤の比が 2:1 の場合 10g、1:1 の場合 20g、1:2 の場合 40g とした。

氷冷下の分散剤－塩酸水溶液を回転式ホモジナイザーで 3000-5500rpm の速度で撹拌しながら、50°C に維持した水酸化ナトリウム－レバミピド溶液を分散剤－塩酸水溶液中に徐々に添加した後、レバミピド結晶を析出させた。水酸化ナトリウム－レバミピド溶液を全て添加し、20 分間撹拌した。一夜放置後、5N 水酸化ナトリウム溶液を添加し、pH を 6 に調整した。

このようにして得られたレバミピド水性懸濁溶液を、超高速液/液せん断式ホモジナイザーを用いて、ローターを 18000rpm、スクリーンを 16000rpm で 40 分間、分散を行い、一次粒子まで分散した。この溶液を透析装置で濃縮脱塩を行った。

この得られた懸濁液のレバミピド濃度を測定し[61]、所定のレバミピド濃度になるように精製水を加え、表 4-3 に組成を示すレバミピド液剤を調製した。分散剤が低分子量の HPMC（TC-5E）であるレバミピドサブミクロン懸濁液を用いて、低粘度製剤の液剤 C は等張化剤（D-ソルビトール）を加え、中粘度製剤の液剤 D は D-ソルビトールと粘度増強剤（HPC）を加え、ゲル製剤の液剤 E は, D-ソルビトールとゲル化剤（HPMC 60SH4000）を加えた。分散剤が低分子量の PVP であるレバミピドサブミクロン懸濁液を用いて、低粘度製剤の液剤 F は D-ソルビトールと甘味剤（ステビア）と保存剤（パラオキシ安息香酸メチル）と 1%PVPK90 を加え、中粘度製剤の液剤 G は D-ソルビトールとステビアと粘度増強剤として 3%PVPK90 を加え、中粘度製剤の液剤 H は D-ソルビトールとステビアとパラオキシ安息香酸メチルと粘度増強剤として 5%プルランを加えた。最終処方である液剤 I は、分散剤が PVPK30 であるレバミピドサブミクロン懸濁液に、D-ソルビトールとステビアとパラオキシ安息香酸メチルとストロベリー香料に粘度増強剤として 2%PVPK90 と 2%プルランを加えた。

また比較対照として、2%レバミピドマイクロ結晶粒子を含む液剤 A と B を調製した。マイクロ懸濁液 A は精製水に所定量のカルボキシメチルセルロースナトリウムと D－ソルビトールを溶解し、pH を 6 に調整した。この製剤用溶媒にレバミピド原末を懸濁し、2%レバミピド液剤 A を調製した。マイクロ結晶粒子を含む液剤 B は、

精製水に PVPK30、PVPK90、D-ソルビトール、ステビア、パラオキシ安息香酸メチル、ストロベリー香料を溶解し、pH を 6 に調整した。この製剤用溶媒にレバミピド原末を懸濁し、2%レバミピド液剤 B を調製した。

調製した製剤の粘度は、回転粘度計で測定した。平均粒子径はレーザー回折粒度分布測定装置を用いて測定した。各製剤の粘度と平均粒子径を表 4-3 に示した。

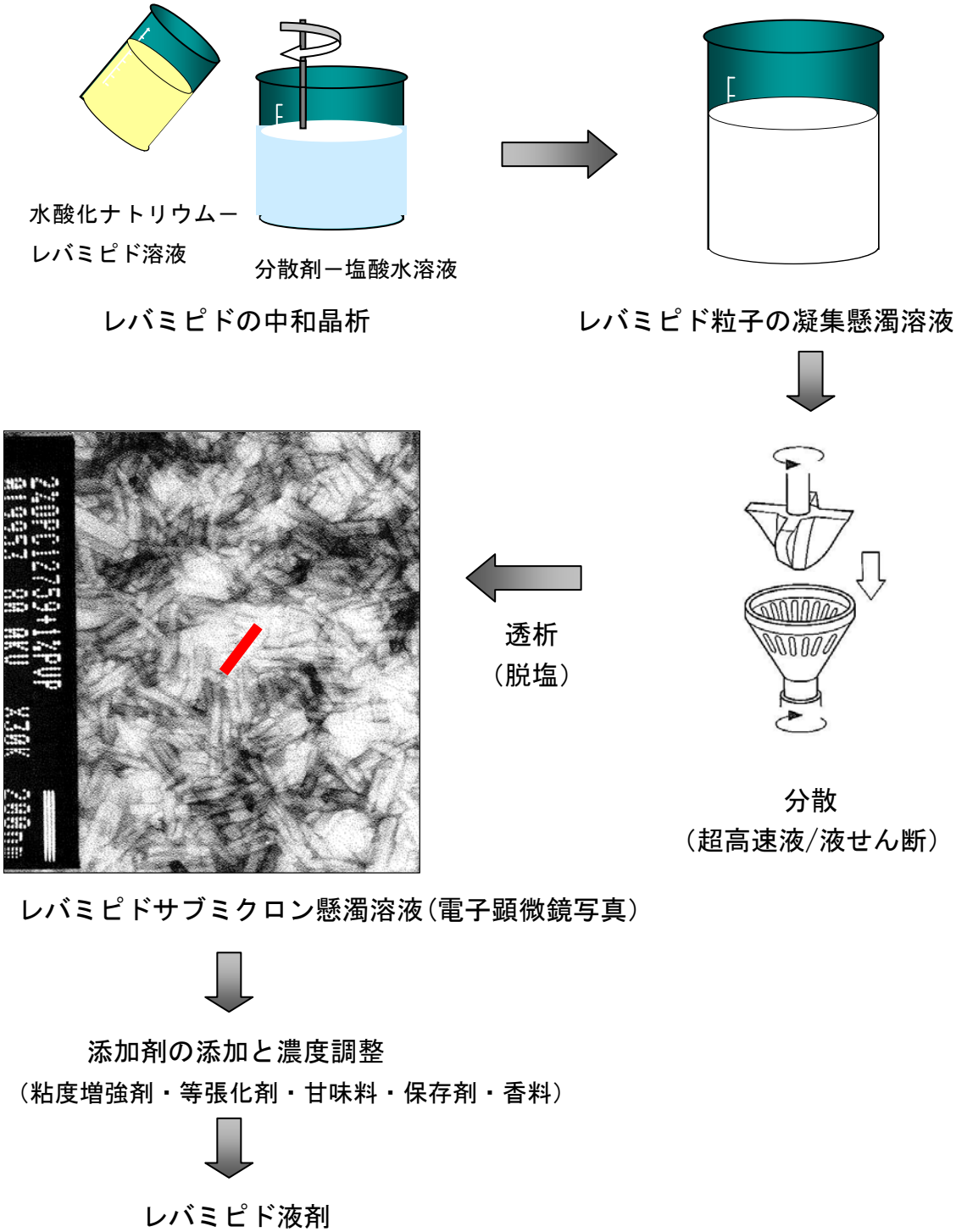


図 4-1　　レバミピド液剤の調製

表　4-3　　レバミピド各種液剤の組成、平均粒子径と粘度

サンプル		マイクロ結晶懸濁液		サブミクロン結晶懸濁液								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I		
主薬	レバミピド	20	20	20	20	20	20	20	20	1%	2%	4%
										10	20	40
分散剤	CMCNa	5	-	-	-	-	-	-	-	-		
	HPMC (TC-5E)	-	-	20	20	20	-	-	-	-		
	PVP K25	-	-	-	-	-	-	20	-	-		
	PVP K30	-	10	-	-	-	10	-	10	10		
増粘剤	HPC	-	-	-	20	-	-	-	-	-		
	HPMC (60SH4000)	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-		
	PVP K90	-	20	-	-	-	10	30	-	20		
	プルラン	-	20	-	-	-	-	-	50	20		
等張化剤	ソルビトール	40	38	40	40	40	40	40	40	38		
甘味剤	ステビア	-	0.7	-	-	-	0.5	0.5	0.5	0.7		
保存剤	パラオキシ安息香酸メチル	-	1	-	-	-	1	-	1	1		
香料	ストロベリー香料	-	0.8	-	-	-	-	-	-	0.8		
溶剤	精製水	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.		
平均粒子径（μm）	Mean	13.9	10.4	0.08	0.17	N.T.	0.09	0.09	0.17	0.18	0.11	0.17
	S.D.	0.5	0.6	0.32	0.11	N.T.	0.31	0.28	0.10	0.10	0.21	0.12
粘度（mPa・s）		12	23	8	42	Gel	5	25	27	26	50	141

製剤用溶媒は各製剤処方からレバミピドを除いた溶液

SD: 標準偏差,　NT: 粒子の凝集のため測定不能

(2) ラット口腔内潰瘍モデルを用いた各種レバミピド液剤の治癒促進効果の検討

第 2 章第 2 節第 2 項(1)に示した方法に従って、焼灼法によるラット口腔内潰瘍を惹起した。即ち、7 週令の雄性ラットをイソフルラン吸入麻酔後、仰向けにし、開胸器を用いて上顎と下顎を開けて左側口腔粘膜の中央部に先端の直径が 2 mm のモノポーラーを当て焼灼することにより口腔内潰瘍を惹起した。焼灼後は飼育ケージに戻し、自然覚醒させた。惹起後、疼痛軽減のためキシロカイン軟膏を惹起部に塗布を行った。

口腔内潰瘍惹起日を Day 0 とした。口腔内潰瘍惹起 2 日後（Day 2）に、体重に基づいて層別無作為抽出法により群分けを行った。口腔内潰瘍を惹起した 3 日後（Day 3）から、レバミピド懸濁液とそれぞれの製剤用溶媒（レバミピドを除いた溶媒）を 0.5 mL/kg の用量で口腔内に 1 日 4 回、5 日間投与した。投与方法としては、イソフルラン吸入により麻酔したラットを左側臥位に寝かせ、ピンセットまたは開胸器を用いて口腔を開いた状態で固定し、潰瘍を作製した左頬に溶液を投与した。Day 8 における潰瘍面をデジタルカメラで写真撮影し、面積解析ソフト（WinROOF ver.5.7.2、三谷商事、日本、東京）を用いて口腔内潰瘍面積を測定した。口腔内潰瘍面積に関して、製剤用溶媒群と各レバミピド製剤群間の比較を、用量依存性試験を除き *t*-test で行った。用量依存性試験は、製剤用溶媒群と各レバミピド製剤群間の比較を Dunnett's test で行った。P 値が 0.05 未満を有意とした。

(3) レバミピド液剤の口腔内及び胃内投与後の血漿中及び口腔粘膜内濃度の測定

口腔内投与は、無処置の 9 週令の SD 系雄性ラットを覚醒下、口腔内に経口投与用ゾンデを用いて舌にゆっくりと垂らすように単回投与した。胃内投与は、常法に従い経口投与用ゾンデを用い胃内に薬液を投与した。各薬剤を投与 5、15、30、60、120、240 及び 480 分後にイソフルラン麻酔下にて腹部大静脈よりヘパリン採血した。放血致死後、左頬及び舌組織を採取した。血漿、頬及び舌組織のホモジネート液（10 %）を調製し、LC/MS/MS 法によりレバミピド濃度を測定した [62]。

(4) ラット放射線誘発舌炎モデルを用いたレバミピド液剤の効果

雄ラットを第 3 章第 2 節第 2 項(1)に示した方法に従い、X 線を単回照射することにより、舌炎を惹起させた [63]。照射 7 日前より 1 日 6 回、覚醒下において、口腔内に経口投与用ゾンデを用いて舌にゆっくりと垂らすように、レバミピド液剤を投与することにより口腔粘膜炎予防効果を評価した。

即ち、ペントバルビタールナトリウム 45 mg/kg 腹腔内投与にて、麻酔したラットを口吻部（眼から先の部位）のみ露出するよう専用鉛板（厚さ 0.5 mm）で 2 重に被覆し、X 線照射装置を用いて口吻部に 15 Gy の照射線量を単回照射した。X 線を単回照射した日を開始日（Day 0）と規定した。

照射 8 日前（Day -8）に体重に基づいて、層別無作為抽出法により群分けを行った。

照射 7 日前（Day -7）から Day 6 まで、2%レバミピド液剤（I）と製剤用溶媒（レバミピドを除いた溶媒）を 0.5mL/kg の用量で覚醒下ラットの口腔内に 1 日 6 回、計 14 日間投与した。

X 線照射後 7 日目（Day 7）にラットをイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大動静脈切断により放血し、安楽死させた。この後、第 3 章第 2 節第 2 項(4)に示した方法に従い、舌を摘出し、デジタルカメラで写真撮影した。面積解析ソフト（WinROOF ver.5.7.2、三谷商事、日本、東京）を用いて、舌表面積(A)、舌表面が白板状化した部位と潰瘍化した部位の総面積（全傷害面積）(B)及び舌表面が潰瘍化した部位の面積（潰瘍様面積）(C)をそれぞれ測定し、舌表面積(A) に対する後者 2 つ(B 及び C) の面積割合を下記のように算出した。順に舌全傷害部 B 面積率、舌潰瘍様傷害部 C 面積率とした。

舌全傷害部 B 面積率%= (B ÷A) x 100

舌潰瘍様傷害部 C 面積率%= (C ÷ A) x 100

有意差検定は舌全傷害部 B 面積率(%)及び舌潰瘍様傷害部 C 面積率(%)を用いて、*t*-test を行った。P 値が 0.05 未満を有意とした。

第３節　　実験結果

第１項　　レバミピド液剤の調製

焼約によるラット口腔粘膜炎モデルで評価したレバミピド液剤の組成及び粘度と平均粒子径を表 4-3 に示した。

カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMCNa）に懸濁した各種含嗽液が院内製剤として使用されている[64]。そこで、レバミピド原末を 0.5%CMCNa 溶液に懸濁させた 2%レバミピド懸濁液（液剤 A）を調製した。液剤 A は、平均粒子径が 13.9 μm であるレバミピドのマイクロ粒子の懸濁液であり、その粘度は 12 mPa･s であった。

レバミピドは中性で難溶解性薬物であることから、レバミピドの口腔粘膜への分布を高めるために、レバミピドの微粒子化（サブミクロン化）を試みた。低分子量の HPMC 又は PVP 溶液における中和晶析[60]により、レバミピド懸濁液を調製したところ、平均粒子径が約 0.1 μm のサブミクロン懸濁液が調製された。これらサブミクロン懸濁液に等張化剤等を添加し、平均粒子径が約 0.1 μm で、粘度が 10 mPa･s 未満の液剤 C（分散剤：HPMC TC-5E）と液剤 F（分散剤：PVP K30）を調製した。

上記のレバミピド液剤 C と液剤 F は低粘性溶液であったため、口腔内への滞留性の向上を目的に、これらレバミピドのサブミクロン懸濁液に粘度増粘剤を添加した。しかし、レバミピドサブミクロン懸濁液は凝集しやすく、通常の粘度増強剤では粒子の凝集及び凝集による沈降が認められ、分散剤によって異なる特定の粘度増強剤を使用した時のみ、粒子の凝集性が少なく製剤の粘性を上げることが可能であった。すなわち、分散剤として HPMC（TC-5E）を使用し、粘度増強剤として 2%HPC を使用した液剤 D の粘度は 42 mPa･s であったが、平均粒子径は 0.17 μm であり、粒子の凝集は少なかった。分散剤として PVPK25 を使用し、粘度増強剤として 3%PVPK90 を使用した液剤 G の平均粒子径は 0.09 μm であり、その粘度は 25 mPa･s であった。分散剤として PVPK30 を使用し、粘度増強剤として 5%プルランを使用した液剤 H の平均粒子径は 0.17 μm であり、その粘度は 27 mPa･s であった。

分散剤として低分子の HPMC（TC-5E）を使用したレバミピドサブミクロン懸濁液は、高分子の HPMC（60SH4000）を添加することで、粒子間の相互作用によりゲル化することが報告されている[65]。このように調製したゲル製剤（液剤 E）は、粘性が非常に高く、粒子が凝集しているため、平均粒子径の測定は不可能であった。

第２項　　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルにおける各種レバミピド液剤の潰瘍面積縮小効果

焼約によるラット口腔粘膜炎モデルにおいて、上記第 1 項にて調製した各種レバミピド液剤の治癒促進効果を検討した。

レバミピド原末を単純に懸濁して調製したレバミピドのマイクロ粒子の懸濁液であるレバミピド液剤 A とその製剤用溶媒を、焼灼法により口腔内潰瘍を惹起させたラットの口腔内に 0.5mL/kg の用量で 1 日 4 回 5 日間投与後の口腔内潰瘍面積を測定した。結果を図 4-2 (a) に示す。残念ながら、溶媒投与群に対して 2%レバミピドマイクロ懸濁液投与群は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められなかった。レバミピドは中性で難溶解性薬物であることから、マイクロ粒子では口腔内で溶解速度が低いため、口腔内レバミピド組織濃度が薬効を発揮する濃度に達していない可能性が考えられた。そこで、レバミピドの口腔内での溶解速度を高めることにより、レバミピドの口腔粘膜内への分布を高める可能性があるサブミクロン懸濁液を評価した。

HPMC（TC-5E）を分散剤として、2%レバミピドサブミクロン結晶を含むレバミピド液剤 C-E を調製した。2%レバミピド液剤 C は粘度増強剤無配合の低粘度溶液である。液剤 D は粒子の凝集性が小さい粘度増強剤として 2%HPC(L)を添加した中粘度溶液である。また、高分子量の HPMC（60SH4000）を 0.1%添加することで、サブミクロン結晶粒子が凝集した高粘度のゲル製剤を調製した（液剤 E）。これらの液剤とそれぞれの製剤用溶媒を、焼灼法によるラットの口腔粘膜炎モデルに 5 日間投与し、口腔内潰瘍面積を測定した。結果を図 4-2 (b) に示す。溶媒投与群に対して、粘性の低い 2%レバミピド液剤 C 投与群は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められなかった。一方、溶媒投与群に対して、粘性を付与した 2%レバミピド液剤 D 投与群は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められた（$p<0.05$）。しかしながら、ゲル化した高粘度製剤である 2%レバミピド液剤 E 投与群は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められなかった。

レバミピドのマイクロ粒子と比較してレバミピドのサブミクロン粒子は比表面積が大きいため、口腔内でのレバミピドの溶解速度は高いと考えられる。しかし、粘性の低い液剤 C ではレバミピドのサブミクロン粒子の口腔内滞留性が低いことにより溶解速度の影響が低下し、有意な口腔内潰瘍面積縮小効果が認められなかったと考えられた。一方、粘性がある液剤 D では、レバミピドのサブミクロン粒子が口腔内に滞留し、粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、レバミピドが口腔粘膜に有効濃度分布し、有意な効果を発揮したと考えられた。一方、ゲル化した高粘度製剤である液剤 E では、高粘度により口腔内滞留性が高いと考えられるが、サブミクロン結晶粒子の凝集により溶解速度が低下した結果、有意な口腔内潰瘍面積縮小効果が認められなかったと考えられた。

PVPK25 又は K30 を分散剤として、2%レバミピドサブミクロン結晶を含むレバミピド液剤 F-H を調製した。レバミピド液剤 F は 1%PVPK90 を添加した低粘度溶液であ

り、レバミピド液剤 G は 3%PVPK90 を添加した中粘度溶液であり、レバミピド液剤 H は 5%プルランを添加した中粘度溶液である。これらの液剤とそれぞれの製剤用溶媒を、焼灼法によるラットの口腔粘膜炎モデルに 5 日間投与し、口腔内潰瘍面積を測定した。結果を図 4-2 (c) に示す。溶媒投与群に対して、粘性の低い 2%レバミピド液剤 F 投与群は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められなかった。一方、溶媒投与群に対して、中程度の粘性を付与した 2%レバミピド液剤 G と H は、有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められた（$p<0.01$）。

粘性の低い液剤 F では、上記の HPMC（TC-5E）を分散剤とした液剤 C と同様に、レバミピドのサブミクロン粒子の口腔内滞留性が低いことにより溶解速度の影響が低下し、有意な口腔内潰瘍面積縮小効果が認められなかったと考えられた。一方、粘性がある液剤 G と H では、上記の HPMC（TC-5E）を分散剤とした液剤 D と同様に、レバミピドのサブミクロン粒子が口腔内に滞留し、粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、レバミピドが口腔粘膜に有効濃度分布し、有意な効果を発揮したと考えられた。

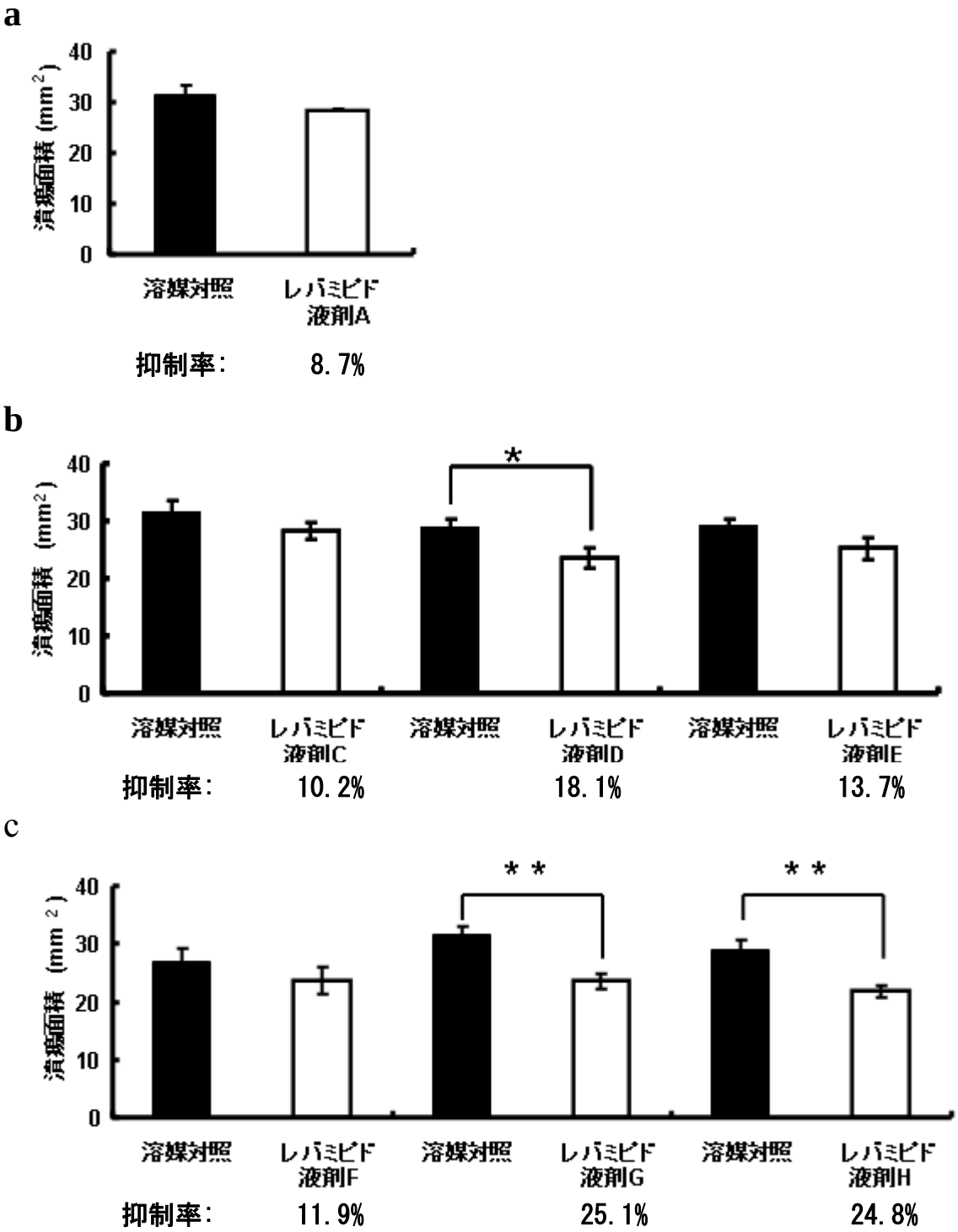


図 4-2 ラット口腔内潰瘍に対する 2%レバミピド液剤の治癒促進効果

(a) マイクロ結晶粒子を含む液剤の効果（処方 A）

(b) サブマイクロ結晶粒子を含む液剤の効果（HPMC 処方、処方 B - D）

(c) サブマイクロ結晶粒子を含む液剤の効果（PVP 処方、処方 E - G）

データは平均値±標準誤差で表した（N=6）。 *p<0.05, **p<0.01 vs. 溶媒対照群 (*t*-test).

抑制率：溶媒投与群の潰瘍面積に対する抑制率

第３項　　焼約によるラット口腔粘膜炎モデルにおける１%、２%および４%レバミピド液剤の潰瘍面積縮小効果

分散剤として短分子量の PVP（K25 又は K90）を、粘度増強剤として PVPK90 又はプルランを添加したレバミピドサブミクロン結晶を含むレバミピド液剤 G と H が最も高い潰瘍面積抑制率を示した（図 4-2）。一方、レバミピド液剤は口腔粘膜炎患者の口腔内に投与される薬剤であるため、最終製剤には、等張剤、甘味料、防腐剤と香料の配合が必要である。そこで、分散剤として低分子量の PVP を選択し、保存安定性や添加剤の安全性、各種添加剤との配合性を考慮し、処方を最終化したレバミピド液剤 I を調製した。

即ち、PVPK30 を分散剤として、粘度増強剤として PVPK90 とプルラン、等張化剤として D-ソルビトール、甘味料としてステビア、保存剤としてパラオキシ安息香酸メチル、香料としてストロベリー香料を加え、1%、 2%、 4%のレバミピド液剤 I を調製した。

これらの液剤と製剤用溶媒を、焼灼法により口腔内潰瘍を惹起させたラットの口腔内に 5 日間投与し、口腔内潰瘍面積を測定した。結果を図 4-3 に示す。潰瘍面積減少率は、1%、2%及び 4%レバミピド液剤 I 投与群で順に、13.9%、25.3%及び 33.0%で溶媒投与群に対して用量依存的な潰瘍面積縮小が認められた。溶媒投与群に対して、2%、4%レバミピド液剤投与群で有意な口腔内潰瘍面積縮小が認められた（$p<0.01$）。

臨床のパイロット試験の製剤は低濃度（0.1%又は 0.2%）製剤が用いられているが、本研究においては 4%までは高濃度製剤ほど、潰瘍面積縮小効果が高いことが示された。高濃度製剤ほど粘膜近傍に滞留するレバミピド量が多くなると推定される。粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、高濃度製剤ほど粘膜近傍に溶解するレバミピド量が多くなり、有意な効果を発揮したと考えられた。

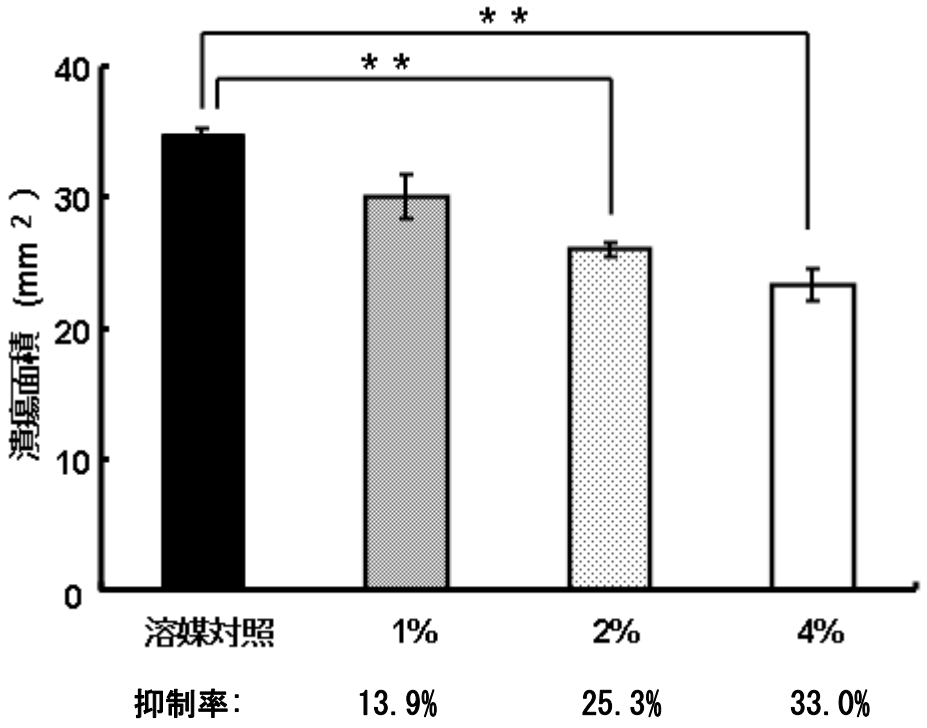


図 4-3　　ラットロ腔内潰瘍に対するレバミピド液剤(I)の濃度依存的な治癒促進効果

データは平均値±標準誤差で表した（N=7）。
*p<0.05, , **p<0.01 vs. 溶媒対照群 (Dunnet'S test).
抑制率：溶媒対照群の潰瘍面積に対する抑制率

第４項　　レバミピド液剤の口腔内粘膜組織への分布

In vitro において、レバミピドがさまざまな抗炎症作用を発揮するためには、10^{-6}M（0.37 μg/g tissue）～10^{-4}M（37 μg/g tissue）の濃度が必要とされている[13, 16]。慢性胃炎患者 32 例を対象に、レバミピド 100mg を空腹下で単回投与後、胃粘膜と血液を採取し薬物濃度を測定した結果、平均胃粘膜内薬物濃度（投与後 30～120 分）（n=20）: 60.0 ± 109.8 μg/g tissue、平均血清中薬物濃度（投与後 30～120 分）（n=18）: 0.25 ± 0.23 μg/mL であったことが報告されており[66]、レバミピドの胃炎・胃潰瘍に対する効果は、全身吸収されたレバミピドが効果を発揮しているのでなく、胃粘膜に直接分布したレバミピドが効果を発揮していると考えられている。

レバミピド液剤の口腔粘膜炎に対する治療・予防効果に対しても、レバミピドの口腔粘膜内への直接的な分布が重要であると考えられる。そこで、口腔内粘膜とレバミピドの直接接触の効果を評価するために、覚醒下ラットに 0.5 mL/kg の用量で、2%レバミピドサブミクロン結晶粒子を含む液剤（I）を左頬に口腔内投与または胃内投与を行い、血漿中、左頬及び舌組織内レバミピド濃度を測定した。

結果を図 4-4 に示す。口腔内投与において、血漿中濃度と比較してレバミピドは口腔内組織に高濃度分布した。従って、口腔内投与時のレバミピド液剤の口腔粘膜への分布は、全身吸収され血中に移行したレバミピドが口腔粘膜に分布しているのでなく、口腔内投与時に口腔粘膜に接触したレバミピドが口腔粘膜に直接分布し、薬効を発揮していると考えられた。又、口腔内投与後の左頬及び舌組織内レバミピド濃度は、胃内投与よりも高濃度であることから、レバミピドの口腔内濃度を高めるためには、レバミピド液剤のようにレバミピドが直接口腔粘膜に接触できる製剤を口腔内に投与する必要があると考えられた。又、レバミピド液剤を口腔内投与５分後のレバミピドの左頬及び舌組織内レバミピド濃度は約 2.5×10^{-5} M の濃度を示したことから、胃炎・胃潰瘍に対して知られているレバミピドの作用の中で、幾つかの作用を発揮できる組織濃度に達していると考えられた。

吸収と分布の観点からレバミピドの結晶サイズの影響を評価するために、液剤 I と同組成で 2%レバミピドマイクロ結晶粒子を含む液剤（B）を左頬に口腔内投後の血漿中、頬及び舌組織内レバミピド濃度を測定した。結果を図 4-4 に示す。サブミクロン結晶粒子を含む液剤（I）の血漿中濃度レベルは、マイクロ結晶粒子を含む液剤（B）よりもやや高レベルであった（図 4-4 a）ことから、サブミクロン化することで、消化管中のレバミピドの溶解性が高まることで、生物学的利用率もやや向上したと考えられた。サブミクロン結晶粒子を含む液剤（I）の口腔内投与 5 分後の左頬及び舌組織内レバミピド濃度は、マイクロ結晶粒子を含む液剤（B）の組織濃度よりも高濃度であった。従って、レバミピドのサブミクロン粒子が口腔内に滞留し、粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、投与直後にレバミピドが口腔粘膜に高濃度分布したと考えられた。

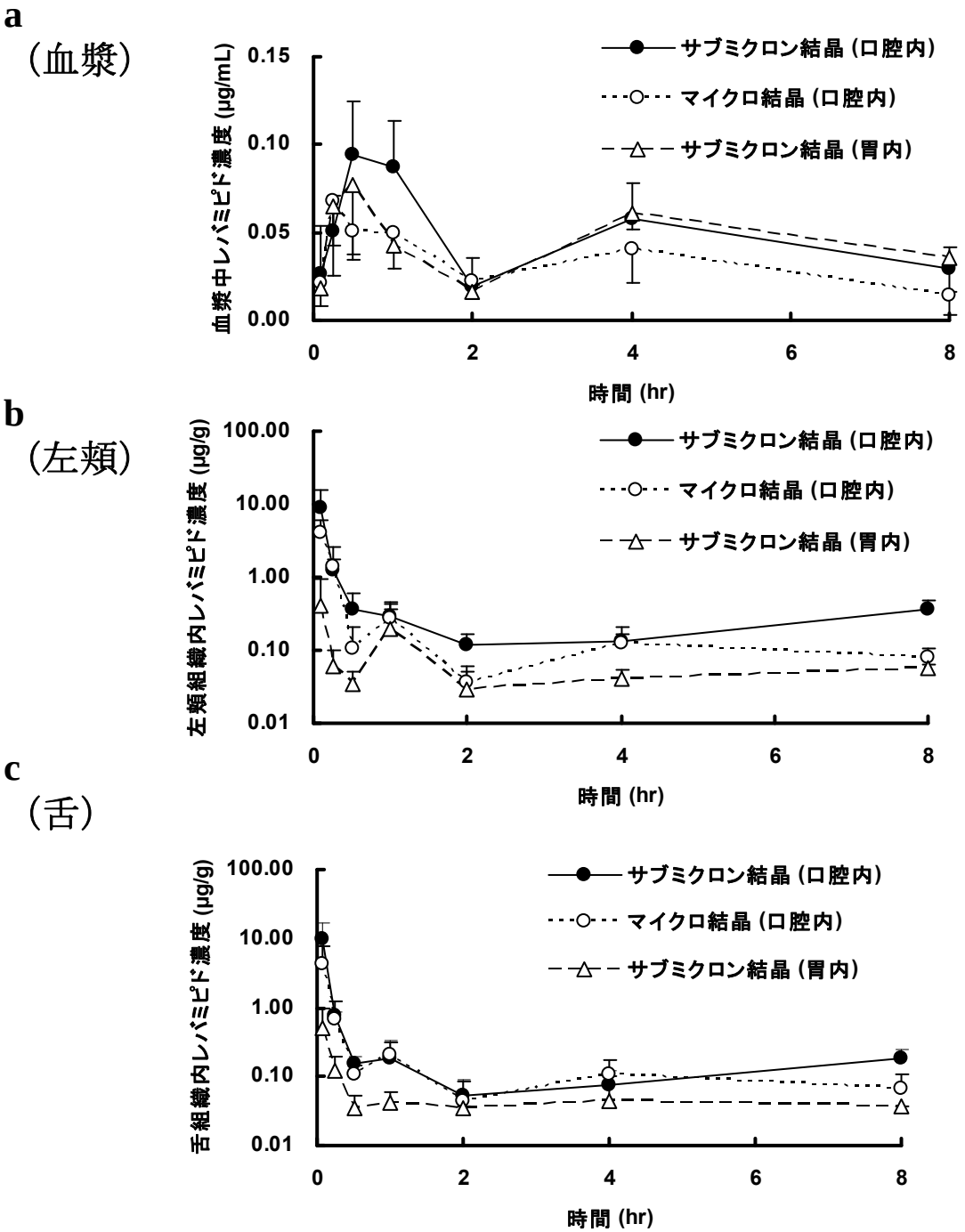


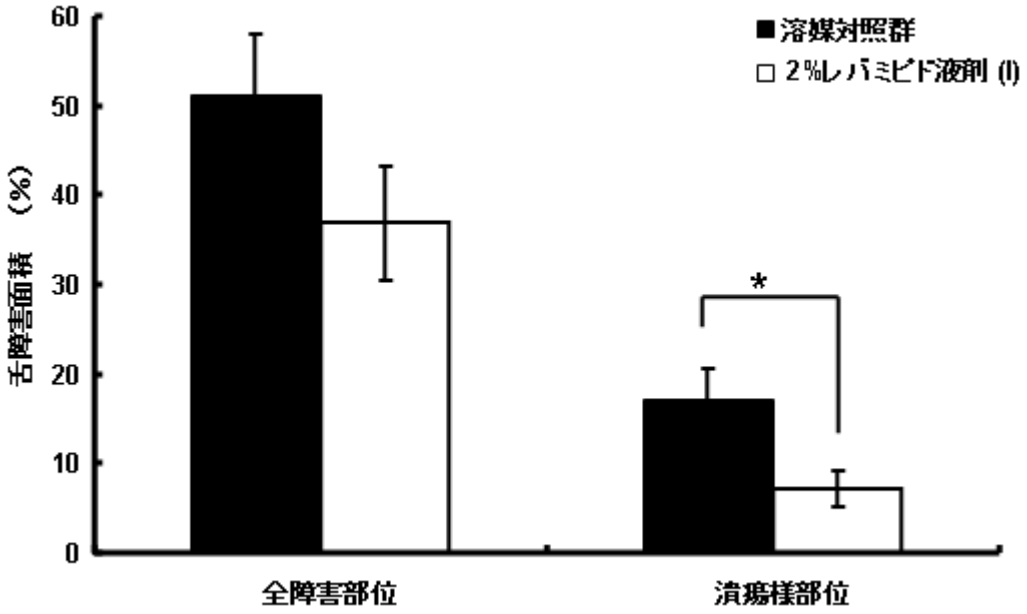
図 4-4　　2%レバミピド液剤のラット口腔内及び胃内投与後の血漿中、左頬及び舌組織内濃度

● サブミクロン結晶を含む液剤（I）を口腔内投与
○ マイクロ結晶を含む液剤（K）を口腔内投与
◆ サブミクロン結晶を含む液剤（I）を胃内投与
(a) レバミピドの血漿中濃度推移
(b) レバミピドの左頬組織内濃度推移
(c) レバミピドの舌組織内濃度推移
データは平均値±標準偏差で表した（N=３）。

第５項　X線照射によるラット口腔粘膜炎モデルに対するレバミピド液剤の効果

放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症機序は複雑であるため、口腔粘膜炎治癒促進効果がある薬剤が放射線療法に伴う口腔粘膜炎予防・治療に有効であるとは限らない。そこで、放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎に対するレバミピド液剤 I の有用性を評価するため、第 3 章において開発した臨床における放射線療法と類似したX線照射による誘発したラット口腔粘膜炎モデルに対するレバミピド液剤の効果を検討した。

第 3 章に述べた X 線照射による誘発したラット口腔粘膜炎モデルにX線照射 7 日前から 2%レバミピド液剤（I）及び媒体溶媒を口腔内に 1 日 6 回 14 日間投与し、X 線照射 7 日後における舌炎傷害面積を測定した。結果を図 4-5 に示す。舌全傷害部面積率に関しては、溶媒投与群が 51.0%、2%レバミピド液剤（I）投与群が 36.9%であり、縮小傾向が認められたが、有意差は認められなかった。舌潰瘍様傷害部面積率に関しては、溶媒投与群が 17.0%、2%レバミピド液剤（I）投与群が 7.2%であり、有意な舌潰瘍様面積率の抑制が認められた（$p<0.05$、*t*-test）。



抑制率:　　27.6%　　57.9%

図 4-5　　放射線誘発ラット舌炎モデルにおける 2%レバミピド液剤（I）の予防効果

データは平均値±標準誤差で表した（N=8）。 *p<0.05,　**p<0.01 vs. 溶媒対照群 (*t*-test).
抑制率：溶媒投与群の潰瘍面積に対する抑制率

第４節　　考察

頭頸部がんに対する放射線化学療法に伴発する口腔粘膜炎はがん治療継続を困難とする難題であり[33)]、口腔粘膜炎に対する新しい予防・治療法の開発が望まれているため、本項では、口腔粘膜炎に対してより高い効果を有するレバミピド液剤の開発を試みた。

レバミピドは胃潰瘍及び胃炎の胃粘膜病変の改善薬及びドライアイの治療薬として販売されている。副作用発現率も低く、安全性の高い薬剤として知られている。レバミピドの口腔粘膜炎に対する効果も検討されており、放射線療法前にレバミピドを含む含嗽液で含嗽することにより、放射線療法による口腔粘膜炎の予防に効果があることが臨床のパイロット試験において報告されている[20-23)]。上記の報告において、レバミピドを含む含嗽液は、レバミピド錠剤を水やカルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁した例[23)]や、レバミピド錠剤をアルコックス（ポリエチレンオキサイド）とイナゲルの混合溶液に懸濁した例[20-22)]が報告されているが、いずれも 1 回 50mL の低濃度（0.1 %または 0.2%）製剤が使用されており、服用容量や服用方法および携帯性の点で問題を含んでいた。レバミピド含嗽液または含嗽内服液が放射線療法や癌化学療法に伴う口腔粘膜炎治療に広く用いられるためには、口腔粘膜炎に対するより強い効果があり、患者が使用しやすいように使用容量が小さい製剤を開発することが望ましいと考えられた。

レバミピドの口腔粘膜炎に対する治癒促進作用を検討するために、比較的作製手技が簡便で再現性の高い口腔内潰瘍モデルとして、第２章で論述した焼灼法によるラット口腔粘膜炎モデルを用いて、レバミピドの治癒促進効果を評価した。レバミピド原末を単純に懸濁して調製したレバミピドマイクロ結晶粒子の 2%懸濁液は、有意な治癒促進効果が認められなかった（図 4-2 a）。レバミピドは口腔内のような中性領域では難溶解性である。レバミピドの粒子径が大きいレバミピドマイクロ結晶粒子の懸濁液では、口腔粘膜近傍でのレバミピド結晶粒子の溶解速度が低いことから、レバミピドの口腔粘膜内への移行性が悪かったのではないかと考えられた。

そこで、レバミピドの効果発現のためには口腔粘膜への薬剤分布が重要と仮定し、レバミピドの中性における溶解速度を高めるために、レバミピド粒子を微細化（サブミクロン化）し、粘性を付与した各種 2%レバミピドサブミクロン懸濁液を調製した。これらレバミピド液剤を口腔内投与し、ラット口腔内潰瘍モデル治癒促進作用について検討した。その結果、粘性の低い製剤は有意な治癒促進効果を示さなかったが、凝集性が低い粘度増強剤を添加して粘度を 20-50 mPa･s に調整した製剤では有意な治癒促進効果が得られることが分かった（図 4-2 b, c）。粘性があるサブミクロン懸濁液では、レバミピドのサブミクロン粒子が口腔内に滞留し、粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、レバミピドが口腔粘膜に有効濃度分布し、有意な効果を発揮したと考えられた。従って、製剤の粒子径と粘性が口腔粘膜炎に対する効果に重要な役割を示すことが示唆された。一方、粘性が高いがサブミクロン粒子が

凝集しているゲル製剤では、2%投与において有意な治癒促進効果は認められなかった。高粘度又は粒子の凝集は、レバミピドの口腔内滞留性または溶解速度を低下させることにより、レバミピドの効果発現を阻害するかもしれない。従って、口腔粘膜炎治癒促進効果を発揮するためには、レバミピド粒子が凝集せず適度な粘性を有することが重要であると考えられた。また、レバミピド液剤 1 日 4 回口腔内投与による用量依存性を検討したところ、4%までの範囲では高濃度製剤が口腔粘膜炎の治癒促進効果に優れていることが示唆された（図 4-3）。尚、4%製剤では、サブミクロン粒子間の相互作用により、やや製剤粘度が高くなった（表 4-3）ことから、粘度によるレバミピド粒子の滞留性の影響も否定できない。4%を超えるサブミクロン懸濁液は、さらに粘性が増大することから、粒子の凝集および粘性増大による飲用性の低下の懸念があるため、検討を行わなかった、以上のことから、本研究により、適度な粘性を有し、高濃度のサブミクロンのレバミピド粒子が凝集なく分散している液剤が、口腔粘膜炎に対して高い治癒促進効果示す製剤であることが示唆された。

レバミピド液剤の口腔内投与又は胃内投与の治癒促進作用を予備検討したことところ、口腔内投与と比較して胃内投与では作用が減弱した（Data not shown）。そこで、レバミピド液剤の口腔粘膜組織分布に関する有用性を確認するために、サブミクロン粒子を含む液剤を覚醒ラットに口腔内投与及び胃内投与を行い、口腔内組織濃度を評価した（図 4-4）。その結果、胃内投与と比較して口腔内投与では、高い左頬組織内濃度及び舌組織内濃度を示した。又、口腔内投与において、血漿中濃度と比較してレバミピドは口腔内組織に高濃度分布した。従って、口腔内投与時のレバミピド液剤の口腔粘膜への分布は、口腔粘膜に接触したレバミピドが直接粘膜へ分布し、薬効を発揮していると考えられた。これらのことから、胃炎・胃潰瘍と同様に、レバミピド液剤の口腔粘膜炎に対する薬効も、口腔内でレバミピド液剤が直接患部に接触する直接経路が重要であると示唆された。In vitro において、レバミピドがさまざまな抗炎症作用を発揮するためには、10^{-6} M～10^{-4} M の濃度が必要とされている[13, 16]。レバミピド液剤を口腔内投与 5 分後のレバミピドの左頬及び舌組織内レバミピド濃度は約 2.5×10^{-5} M の濃度を示したことから、胃炎・胃潰瘍に対して知られているレバミピドの作用の中で、幾つかの作用を発揮できる組織濃度に達していると考えられた。

粒子径の影響に関しては、サブミクロン液剤の口腔内投与において、投与 5 分後にマイクロ粒子と比較して、やや高い左頬組織内濃度及び舌組織内濃度を示した。レバミピドのサブミクロン粒子が口腔内に滞留し、粘膜近傍に滞留したサブミクロン粒子の溶解速度が高いことから、投与直後にレバミピドが口腔粘膜に高濃度分布したと考えられた。

なお、本試験では、正常の左頬と舌組織全体のレバミピド濃度を測定している。粘膜上皮や潰瘍部位でのレバミピド濃度が薬効に影響している可能性が考えられるが、それらの部位に対するサブミクロン粒子の移行性は不明であり、サブミクロン粒子の有用性を検討するためには、レバミピドの炎症粘膜表層への移行性の評価を今後進める必要があると考えられた。

放射線療法前に 0.1%又は 0.2%のレバミピド含嗽液で含嗽することにより、放射線療法による口腔粘膜炎の予防に効果があることが臨床のパイロット試験において報告されているが[20-23]、口腔粘膜炎の治癒促進効果も口腔粘膜炎発症期間や重症度に関して臨床的に重要であると考えられる。本研究において、適度な粘性を有し、高濃度のサブミクロンのレバミピド粒子が凝集なく分散している液剤が、口腔粘膜炎に対して高い治癒促進効果を示す製剤であることが示唆された。この製剤は、臨床のパイロット試験において報告されている製剤よりも口腔粘膜炎を発症している患者の治療において、より良い治癒効果を示す可能性が考えられた。また、本研究で提案した製剤は、高濃度であることから服用性や携帯性にも優れている。

口腔粘膜炎治癒促進効果がある薬剤が放射線療法に伴う口腔粘膜炎予防・治療に有効であるとは限らないため、放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎の治療への薬剤の有用性を評価するためには、臨床における放射線療法と類似した動物モデルで評価する必要がある。第3章において、臨床における放射線療法を反映した動物モデルとして、高線量の X 線をラットの口吻部のみに単回照射することによって舌炎を惹起する放射線誘発舌炎ラットモデルを開発した[63]。臨床における放射線化学療法に伴う口腔粘膜炎の発症機序には、炎症性サイトカイン・ケモカインが深く関与していることが報告されているが、本モデルにおいても炎症性サイトカイン・ケモカインの発現が確認されており、臨床に近似した動物モデルと考えられる[63]。そこで、本研究において、放射線誘発舌炎ラットモデルを用いて、２％レバミピド液剤 I の 1 日 6 回口腔内投与を行った。レバミピド液剤投与群は、有意な舌潰瘍様傷害部面積率の縮小効果が認められた（図 4-5）。従って、筆者が開発したレバミピド液剤は、がん放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎に対して予防・治療薬として期待されることが示唆された。

第５節　　小括

ラット口腔内潰瘍モデルの口腔粘膜炎治癒促進効果を指標として、口腔粘膜炎に対して有効性の高いレバミピド液剤の開発を試みた。レバミピド液剤の口腔内潰瘍の治癒効果を高めるためには、レバミピド粒子をサブミクロン化するとともに、製剤濃度を高濃度化しつつ、適度な粘性を付与することが重要であり、投与方法は口腔内経口投与が好ましいことを明らかにした。最終化したレバミピド液剤は、口腔内組織移行性に優れ、ラット口腔内潰瘍に対する用量依存的な治癒促進効果を示し、放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎の臨床に近いラット放射線誘発舌炎モデルに対しても、潰瘍の縮小効果が認められた。従って、本研究で提案したレバミピド液剤は、がん放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎に対する治療薬または予防薬として、有用な製剤として期待されるものと考えている。

第５章　　総括

がんの化学療法により、口腔粘膜炎等の口腔内粘膜の障害が頻繁に発生することは良く知られており、口腔粘膜炎は通常の抗がん剤治療では30～40%の患者が、抗がん剤を大量使用する造血幹細胞移植時には70～90%の患者が発祥する。その障害の特徴は口腔粘膜への広範な潰瘍形成とそれに伴う極めて強い疼痛にある[2, 33)]。一方、口腔粘膜への放射線照射によって、30 Gy 以上の照射線量で粘膜炎を高頻度に発生するといわれており、放射線療法を受けた頭頸部がん患者では、ほぼ全ての患者に、口腔粘膜炎が発症すると報告されている[67, 68)]。したがって、放射線療法に化学療法を併用すれば、さらに重篤な粘膜炎が出現するのは明白である。このような強烈な口腔粘膜炎の発症により、患者の QOL は極めて悪化する。時に食事の摂取も困難な状況に陥ることから、治療が中断されることも少なくなく、口腔粘膜炎は、がん治療成績の低下をも引き起こす可能性がある重要な問題である。

がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎に対しては予防が重要である。抗がん剤による口腔粘膜炎に対する厚生労働省の重篤副作用疾患別対応マニュアル[8)]によれば、予防治療として、口腔内の保清、保湿を目的とする 1 日 7～8 回のハチアズレやアロプリノールの含嗽、歯石除去やブラッシングによる口腔ケア、口腔内の冷却（oral cryotherapy）、保湿（乾燥予防）等が挙げられている。口腔内を清潔に保つことは、口腔粘膜炎の二次感染の予防や重症化を避けることに役立つと考えられるが、二次的な予防法であることから限界がある。

口腔粘膜炎治療に関しては、副作用疾患別対応マニュアル[8)]において、含嗽および口腔ケアの継続、軽度から中等度の痛みには、局所麻酔薬（リドカインなど）による含嗽に加え、アセトアミノフェンか、非ステロイド性抗炎症薬（解熱消炎鎮痛薬：NSAIDs）の使用、中等度以上の痛みで除痛が困難な場合は麻薬系鎮痛薬の使用、唾液の分泌を促す塩酸ピロカルピン錠、人工唾液などの補助的な使用による粘膜保護等が挙げられているが、確立した治療方法はなく、症状にあわせた対症療法が主である。従って、薬剤等による有効な予防及び治療方法の開発が望まれている。

以上のように、頭頸部がんに対する放線化学療法に伴う重篤な口腔粘膜炎は、がん治療成績の低下をも引き起こす可能性がある重要な問題であるが、現在のところ口腔粘膜炎に対する有効な治療法がない。そこで、筆者は、口腔内粘膜炎に対する予防・治療薬の開発を目的に、薬剤及び製剤の評価のための口腔粘膜炎動物モデルの確立とそれらのモデルを用いた口腔粘膜炎治療薬の開発及び評価を行った。

第 2 章では、薬剤スクリーニングや製剤処方スクリーニングを目的として、動物を用いた簡便で再現性の高い口腔粘膜炎モデルの作成について論述した。すなわち、頬粘膜にモノポーラーをあてて粘膜の一部を焼灼する焼灼法を用いて、限局性の潰瘍性病変を作成した。本モデルにおける潰瘍期から回復期に至る組織学的変化は、臨床における口腔粘膜炎の潰瘍～回復過程に類似した口腔粘膜炎モデルであると考えられた。第 2 章で得られた知見から、頬粘膜の一部を焼灼する焼灼法によって惹起され

た傷害は、非常に再現性に優れ、潰瘍面積にばらつきが少ないことから、薬剤評価に用いやすいモデルであると考えられた。第 4 章において、レバミピド液剤の製剤処方スクリーニングを検討したところ、製剤間の治癒促進効果の差を評価することが可能であった。従って、口腔内潰瘍に対する薬剤の潰瘍治癒促進作用の評価スクリーニングとして、本モデルは有用であると考えられた。

第 3 章では、放射線療法時に頻発する口腔粘膜炎の治療への薬剤の有用性を評価するため、臨床における放射線療法と類似した動物モデルの作成について論述した。放射線あるいは化学療法が引き起こす口腔粘膜炎の発症機序は非常に複雑であるため、放射線療法に伴う口腔粘膜炎に対する薬剤の有用性を評価するためには、臨床における放射線療法と類似した動物モデルが必要である。そこで、ラットの口吻部のみに単回照射することによって新しい X 線誘発舌炎モデルを作製した [63)]。口腔粘膜炎の経時変化を観察したところ、照射 7 日目の舌に潰瘍様の傷害も観察され，ヒトの放射線照射による口腔粘膜炎に類似した症状が観察された。この傷害は、再現性に優れ、均一に発症することから、薬剤評価に用いやすいモデルであることが判明した。炎症性サイトカイン・ケモカインの経日的な発現変化を観察すると、舌炎の傷害形成から修復過程における舌傷害の重症度の変化の推移と一致した。臨床で有効性が示されている palifermin を本モデルで投与することにより、潰瘍が抑制されたことから、本モデルの有用性が検証された。従って、本モデルは、がん化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の発症メカニズムの解明や今後の新しい治療法の評価に有用であると考えられた。

第 4 章においては、第 2 章で確立した焼灼法によるラット口腔内潰瘍モデルの口腔粘膜炎治癒促進効果を指標に、レバミピド液剤の製剤スクリーニングを行い、口腔粘膜炎に対するより強い効果があり、患者が使用しやすい最適なレバミピド液剤の製剤化について検討した。レバミピド含嗽液または含嗽内服液が放射線療法や癌化学療法に伴う口腔粘膜炎治療に広く用いられるためには、口腔粘膜炎に対するより強い効果があり、患者が使用しやすいように使用容量が小さい製剤を開発することが望ましいと考えられた。レバミピド原末を単純に懸濁して調製したレバミピドミクロン結晶粒子の 2%懸濁液は有意な治癒促進効果が認められなかった。従って、筆者らは、レバミピドの効果発現のためには口腔粘膜への薬剤分布が重要と仮定し、レバミピド粒子を微細化（サブミクロン化）し、粘性を付与した各種 2%レバミピドサブミクロン懸濁液を口腔内投与しラット口腔内潰瘍モデル治癒促進作用を検討した。その結果、口腔粘膜炎治癒促進効果を発揮するためには、レバミピド粒子が凝集せず適度な粘性を有することが重要であることを明らかにした。最適化したレバミピド液剤は、口腔内組織移行性に優れ、濃度依存的なラット口腔内潰瘍に対する治癒効果を示した。さらに、第 3 章において確立した臨床に近いラット放射線誘発舌炎モデルにおいても、最終化した 2%液剤は、有意な潰瘍面積抑制効果を確認した。錠剤は重症の口腔粘膜炎患者では嚥下できないといわれているが、本剤は、口腔粘膜炎を生じた患者にも嚥下しやすい粘性のある液剤である。かつ、レバミピド粒子をサブミクロン化し、粒子の沈降による再分散の必要もなく、高濃度化することで小容量化できるため、携帯性と

利便性にも優れる。また、レバミピド特有の苦味に関しても、懸濁製剤であることから溶液製剤よりも抑制されており、小容量であることから服用性にも優れている。また、レバミピドは安全性の高い薬剤であることが知られていることから、本研究において、最終化したレバミピド液剤は、がん治療に頻発する口腔粘膜炎に対する治療薬として、臨床において受け入れやすい薬剤であると考えられる。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻を頂いた徳島大学薬学部教授　石田竜弘博士に心より感謝申し上げます。

学位論文審査において、貴重なご指導とご助言を頂いた徳島大学薬学部に心より感謝申しあげます。また、博士課程への進学及び研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました大塚製薬基盤研究所　大本安一博士、探索第 3 研究所　櫻井一志博士に深甚の謝意を表します。

本研究を遂行するに当たり、多くの技術的なアドバイス並びに指導を賜りました大塚製薬総務部　大坂敏啓様、日々の研究に対しアドバイスを賜りました大塚製薬探索第 3 研究所　植松直也博士、柴森雅文博士、櫻井一志博士、大塚製薬製剤研究所松田貴邦修士、佐古信朋修士及び、探索第 3 研究所消化器グループの皆さんの熱心な協力を得たことを記すとともに心より感謝申しあげます。

最後になりますが、いつも心の支えになってくれた両親に心から感謝します。そして、どのような状況においても応援してくれた素晴らしい夫　松田貴邦に心から感謝します。

引用文献

1) Keeffe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al., Update clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis, *Cancer*, **109**, 820-831 (2007).
2) Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P., Chemotherapy-induced and/orradiation therapy induced oral mucositis-- complicating the treatment of cancer, *Neoplasia*, **6**, 423-431 (2004).
3) Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, et al., Perspective on cancer therapy-induced mucosal injury, *Cancer*, **100**(9), 1995-2025 (2004).
4) Ikesue H, Ishida M, et al., Monitoring for potential adverse drug reactions in patients receiving chemotherapy, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **61**, 2366-2369 (2004).
5) Sonis ST, A biological approach to mucositis, *J. Support Oncol.* **2**, 21–36 (2004).
6) Sonis ST, Oral mucositis in cancer therapy, *J Support Oncol*, **2**(6 Suppl 3), 3-8 (2004).
7) 浅井昌大，全田貞幹，大田洋二郎，田原信ら，頭頸部がん化学放射線療法をサポートする口腔ケアと嚥下リハビリテーション，オーラルケア社，東京，2009
8) 厚生労働省，重篤有害事象疾患別対応マニュアル，抗がん剤による口内炎，2009
9) 日本病院薬剤師会薬剤業務委員会，医療の質向上のためのチーム医療への薬剤師の関与とその成果に関する論文実例集：がん化学療法領域における薬剤師の取り組みと成果，日病薬誌，**47**(8), 983–1002, (2011).
10) MedImmune Pharma B.V., Product Information for ETHYOL® (amifostine) for Injection, 05/2007.
11) Swedish Orphan Biovitrum AB., Product Information for Kepivance® (palifermin) for injection, 05/2013.
12) Uchida M, Tabusa F, Komatsu M, Morita S, Kanbe T, Nakagawa K, Studies on 2(1H)-quinolinone derivatives as gastric antiulcer active agents 2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)–quinolinon-4-yl] propionic acid and related compounds, *Chem Pharm Bull*, **33**, 3775-3786 (1985).
13) Yamasaki K, Kanbe T, Chijiwa T, Ishiyama H, Morita S, Gastric mucosal protection by OPC-12759, a novel antiulcer compound, in the rat, *Eur J Pharmacol*, **142**, 23-29 (1987).
14) Kleine A, Kluge S, Peskar BM, Stimulation of prostaglandin biosynthesis mediates gastroprotective effect of rebamipide in rats, *Dig Dis Sci*, **38**, 1441-1449 (1993).
15) Suetsugu H, Ishihara S, Moriyama N, Kazumori H, Adachi K, Fukuda R, et al., Effect of rebamipide on prostaglandin EP4 receptor gene expression in rat gastric mucosa, *J Lab Clin Med*, **136**, 50-57 (2000).
16) Yoshikawa T, Naito Y, Nakamura S, Nishimura S, Kaneko T, Iinuma S, et al., Effect of rebamipide on lipid peroxidation and gastric mucosal injury induced by indometacin in rats, *Arzneimittelforschung*, **43**(12), 1327-1330 (1993).
17) Naito Y, Yoshikawa T, Tanigawa T, Sakurai K, Yamasaki K, Uchida M, et al., Hydroxyl radical scavenging by rebamipide and related compounds: electron paramagnetic resonance study, *Free Radic Biol Med*, **18**, 117-123 (1995).
18) Sakurai K, Sasabe H, Koga T, Konishi T, Mechanism of hydroxyl radical scavenging by rebamipide: identification of mono-hydroxylated rebamipide as a major reaction product, *Free Radical Res*, **38**, 487-494 (2004).

19) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, Kondo M, Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent rebamipide studied by electron spin resonance, *Arzneimittelforschung*, **43**, 363-366 (1993).
20) Kawata K, Hanawa T, Hanawa K, Takamura T, Suzuki M, Nakajima S, Ito A, Unezaki S, Takahashi G, Sakayori S, Matsuzaki Z, Okamoto Y. Investigation of the Effect of the Rebamipide Mouthwash on the Crisis of the Stomatitis Induced by the Cancer Chemotherapy and/or Radiotherapy, J*ournal of New Remedies & Clinics*, **50**, 273-280 (2001).
21) Yasuda T, Chiba H, Satomi T, Matsuo A, Kaneko T, Miyamatsu H, A pilot study of rebamipide-gargle for chemoradiotherapy-induced mucositis in oral cancer patients, *Gan To Kagaku Ryoho*, **35**(7), 1157-1161 (2008).
22) Yasuda T, Chiba H, Satomi T, Matsuo A, Kaneko T, Chikazu D, et al., Preventive effect of rebamipide gargle on chemoradiotherapy-induced oral mucositis in patients with oral cancer: a pilot study, *J Oral Maxillofac Res*, **2**(4), 1-8 (2011).
23) Tosaka C, Tajima H, Inoue T, Moya M, Kobayashi M, Miura K, Tada Y, Masubuchi T, Hushimi C, Kamata S, Investigation of how to prevent mucositis induced by chemoradiotherapy, *Gan To Kagaku Ryoho*, **38**(10), 1647-1651 (2011).
24) 大塚製薬株式会社, ムコスタ錠 100mg ムコスタ顆粒 20% 医薬品インタビューフォーム 改訂第 10 版, 2012
25) Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DM, Animal Models of Mucositis: Implications for Therapy, *J Support Oncol*, **9**(5), 161-168 (2011).
26) Gibson RJ, Bowen JM, Inglis MR, Cummins AG, Keefe DM, Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer, *J Gastroenterol Hepatol*, **18**(9), 1095–1100 (2003).
27) Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS, Hamilton J, Keefe DM, Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis, *Exp Biol Med (Maywood)*, **234**(4), 430–441 (2009).
28) Slomiany BL, Piotrowski J, Slomiany A, Role of endothelin-1 and interleukin-4 in buccal mucosal ulcer healing: Effect of chronic alcohol ingestion, *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 373–377 (1999).
29) Ishiyama H, Kawai K, Azuma A, Therapeutic effect of rebamipide in a modified acetic acid-induced buccal mucosal ulcer model, *Inflammopharmacology*, **10**, 391–393 (2002).
30) 村上忠重，切除胃からみた胃及び十二指腸の治癒傾向について，日本消化器病学会雑誌，**58**, 1181-1186 (1961).
31) A. Vissink, Oral Sequelae of Head and Neck Radiotherapy, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **14**, 199 (2003).
32) Sonis ST, Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity, *Oral Oncol*, **34**(1), 39–43 (1998).
33) Lalla RV, Management of oral mucositis in patients with cancer, *Dent Clin North Am*, **52**, 61-77 (2008).
34) Dorr W, Brankovic K, Hartmann B, Repopulation in mouse oral mucosa: changes in the effect of dose fractionation, *Int J Radiat Biol*, **76**(3), 383–390 (2000).
35) Dorr W, Spekl K, Martin M, Radiation-induced mucositis in mice: strain differences, *Cell Prolif*, **35**(suppl 1), 60–67 (2002).
36) Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D, An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **69**(4), 437– 443 (1990).

37) Murphy CK, Fey EG, Watkins BA, Wong V, Rothstein D, Sonis ST, Efficacy of superoxide dismutase mimetic M40403 in attenuating radiation-induced oral mucositis in hamsters, *Clin Cancer Res*, **14**(13), 4292– 4297 (2008).
38) Ara G, Watkins BA, Zhong H, Hawthorne TR, Karkaria CE, Sonis ST, Larochelle WJ, Velafermin (rhFGF-20) reduces the severity and duration of hamster cheek pouch mucositis induced by fractionated radiation, *Int J Radiat Biol*, **84**(5), 401– 412 (2008).
39) Kitagawa J, Nasu M, Okumura H, Shibata A, Makino K, Terada H, Matsumoto S, Allopurinol gel mitigates radiation-induced mucositis and dermatitis. *J Radiat Re*, **49**, 49-54 (2008).
40) Yeoh AS, Gibson RJ, Yeoh EE, Bowen JM, Stringer AM, Giam KA, Keefe DM, A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor-KB, COX-1, and COX-2, *Mol Cancer Ther*, **6**(8), 2319-2327 (2007).
41) Li CY, Chen XH, Tao XA, Xia J, Cheng B, The development and inflammatory features of radiotherapy-induced glossitis in rats, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, **16**, e348-353 (2011).
42) Henke M, Alfonsi M, Foa P, Giralt J, Bardet E, Cerezo L, Salzwimmer M, Lizambri R, Emmerson L, Chen MG, Berger D, Palifermin decreases severe oral mucositis of patients undergoing postoperative radiochemotherapy for head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled trial, *J Clin Oncol*, **29**, 2815-2820 (2011).
43) Le QT, Kim HE, Schneider CJ, Muraközy G, Skladowski K, Reinisch S, Chen Y, Hickey M, Mo M, Chen MG, Berger D, Lizambri R, Henke M, Palifermin reduces severe mucositis in definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled study, *J Clin Oncol*, **29**, 2808-2814 (2011).
44) Murphy CK, Fey EG, Watkins BA, Wong V, Rothstein D, Sonis ST, Efficacy of superoxide dismutase mimetic M40403 in attenuating radiation-induced oral mucositis in hamsters, *Clin Cancer Res*, **14**, 4292-4297 (2008).
45) Mangoni M, Yue X, Morin C, Violot D, Frascogna V, Tao Y, Opolon P, Castaing M, Auperin A, Biti G, Barritault D, Vozenin-Brotons MC, Deutsch E, Bourhis J , Differential effect triggered by a heparan mimetic of the RGTA family preventing oral mucositis without tumor protection, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **74**, 1242-1250 (2009).
46) Takikawa M, Sumi Y, Tanaka Y, Nambu M, Doumoto T, Yanagibayashi S, Azuma R, Yamamoto N, Kishimoto S, Ishihara M, Kiyosawa T, Protective effect of prostaglandin E1 on radiation-induced proliferative inhibition and apoptosis in keratinocytes and healing of radiation-induced skin injury in rats, *J Radiat Res*, **53**, 385-394 (2012).
47) Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM, The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs, *Cancer Treat Rev*, **33**, 448-460 (2007).
48) Farrell CL, Rex KL, Kaufman SA, Dipalma CR, Chen JN, Scully S, Lacey DL, Effects of keratinocyte growth factor in the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract of normal and irradiated mice. *Int J Radiat Biol*, **75**, 609-620 (1999).
49) Kim CD, Hong KW, Preventive effect of rebamipide on gastric lesions induced by ischemia-reperfusion in the rat, *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 340-344 (1995).
50) Kobayashi T, Zinchuk VS, Garcia del Saz E, Jiang F, Yamasaki Y, Kataoka S, et al., Suppressive effect of rebamipide, an antiulcer agent, against activation of human neutrophils exposed to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, *Histol Histopathol*, **15**, 1067-1076 (2000).

51) Nagano C, Azuma A, Ishiyama H, Sekiguchi K, Imagawa K, Kikuchi M, Rebamipide suppresses formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced superoxide production by inhibiting fMLP-receptor binding in human neutrophils, *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 388-394 (2001).
52) Iinuma S, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi S, Takemura T, Yoshida N, Kondo M, In vitro studies indicating antioxidative properties of rebamipide, *Dig Dis Sci*,**43** (9 Suppl), 35S-39S (1998).
53) Aihara M, Imagawa K, Funakoshi Y, Ohmoto Y, Kikuchi M, Effects of rebamipide on production of several cytokines by human peripheral blood mononuclear cells, *Dig Dis Sci*, **43**(9 Suppl) 160S-166S (1998).
54) Kim H, Seo JY, Kim KH, Inhibition of lipid peroxidation, NF-kappaB activation and IL-8 production by rebamipide in Helicobacter pylori-stimulate gastric epithelial cells, *Dig Dis Sci*, **45**, 621-628 (2000).
55) Masamune A, Yoshida M, Sakai Y, Shimosegawa T, Rebamipide inhibits ceramid-induced interleukin-8 production in Kato III human gastric cancer cells, *J Pharmac Exp Ther*, **298**, 485-492 (2001).
56) Choe JY, Park KY, Lee SJ, Park SH, Kim SK, Rebamipide inhibits tumor necrosis factor-α-induced interleukin-8 expression by suppressing the NF-κB signal pathway in human umbilical vein endothelial cells, *Inflamm Res*, **59**, 1019-1026 (2010).
57) Arakawa T, Kobayashi K, Yoshikawa T, Tarnawski A, Rebamipide: Overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing, *Dig Dis Sci*, **43**, 5S-13S (1998).
58) Akamatsu T, Nakamura N, Furuya N, Shimizu T, Gotou A, Kiyosawa K, Katsuyama T, Osumi T, Hirao Y, Miyamoto G, Local gastric and serum concentrations of rebamipide following oral ingestion in healthy volunteers, *Dig Dis Sci*, **47**, 1399-1404 (2002).
59) Shioya, Y; Kashiyama, E; Okada, K; et al., Metabolic fate of the anti-ulcer agent, (±)-2-(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl];propionic acid (OPC-12759): Absorption, distribution, and excretion in rats and dogs, *Iyakuhin Kenkyu*, **20** (2), 522–533 (1989).
60) Matsuda T, Hiraoka S, Tomohira Y, Ishikawa S, Aqueous ophthalmic suspension of crystalline rebamipide, Japan Patent 4934587 (2012).
61) Japanese Pharmacopoeia,16th Edition (JP XVI), Rebamipide Tablets, Official Monographs, 1337 (2011).
62) Hasegawa S, Sekino H, Matsuoka O, Saito K, Sekino H, Morikawa A, Uchida K, Koike M, Azuma J, Bioequivalence of Rebamipide Granules and Tablets in Healthy Adult Male Volunteers, *Clin Drug Invest*, **23**(12), 771-779 (2003).
63) Nakashima T, Uematsu N, Shibamori M, Sakurai K, Ishida T, Kiwada H, Establishment of an X-ray irradiation-induced glossitis model in rats: biphasic elevation of proinflammatory cytokines and chemokines mRNA expression and prevention of the tongue injuries by palifermin, *J Pharmacol Exp Ther*, **347**, 660–668 (2013).
64) 仲盛健治，砂川元，平塚博義，新崎章，新垣敬一，狩野岳史，Kuang Hai1，化学放射線療法による口内炎に対する各種含嗽剤の応用，口腔腫瘍，**16**(2), 49-55 (2004).
65) Hiraoka S, Matsuda T, Hydrogel suspension and manufacturing process thereof, Japan Patent 5203355 (2013).
66) Naito Y, Yoshikawa T, Iinuma S, Miyazaki R, Yagi N, Yoshida N, Osumi T, Kondo M, Local gastric and serum rebamipide concentrations after oral application in human,

Arzneim-Forsch Drug Res, **46**(II), 698-700 (1996)

67) 渡辺尚彦，野村恭也，高野信也，金子達ら，放射線口内炎に対するアンサー20(R)注の予防効果，耳鼻展望，**36**, 663-669 (1993).

68) Keefe DM. Mucositis guidelines: what have they achieved, and where to from here? *Support Care Cancer*, **14**(6), 489–491 (2006).