

## 目 次

緒 言	1
略 号	5
第 1 章 CPA 誘発脱毛に対するエダラボン軟膏の抑制効果	
1. 1. 背景・目的	6
1. 2. 方 法	6
1. 2. 1. 実験動物	6
1. 2. 2. CIA モデルラットの作製	6
1. 2. 3. 実験プロトコル	7
1. 2. 4. 被覆率の評価	9
1. 2. 5. 皮膚の採取	9
1. 2. 6. 皮膚組織切片の作製	9
1. 2. 7. 毛包面積の評価	10
1. 2. 8. mRNA 発現量の評価	10
1. 2. 9. Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の算出	12
1. 2. 10. 統計解析	12
1. 3. 結 果	13
1. 3. 1. EDR 軟膏塗布による被覆率スコアに及ぼす効果	13
1. 3. 2. EDR 軟膏塗布による毛包面積に与える影響	16
1. 3. 3. 背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量に対する EDR 軟膏の効果	18
1. 3. 4. 背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA および Bax mRNA 発現量に対する EDR 軟膏の効果	20
1. 3. 5. Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に対する EDR 軟膏の効果	20
1. 4. 考 察	24
第 2 章 CPA 誘発脱毛に対するエダラボンローションの抑制効果	
2. 1. 背景・目的	28
2. 2. 方 法	29
2. 2. 1. 実験動物	29
2. 2. 2. CIA モデルラットの作製	29

2.2.3.	実験プロトコル	29
2.2.4.	被覆率の評価	30
2.2.5.	皮膚の採取	30
2.2.6.	皮膚組織切片の作製	30
2.2.7.	毛包面積の評価	30
2.2.8.	mRNA 発現量の評価	31
2.2.9.	Bcl-2/BAX mRNA 発現量比の算出	31
2.2.10.	統計解析	31
2.3.	結 果	32
2.3.1.	EDR ローション塗布による被覆率スコアに及ぼす効果	32
2.3.2.	EDR ローション塗布による毛包面積に与える影響	35
2.3.3.	背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量に対する EDR ローションの効果	37
2.3.4.	背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA および Bax mRNA 発現量に対する EDR ローションの効果	38
2.3.5.	Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に対する EDR ローションの効果	38
2.4.	考 察	40
	総 括	43
	謝 辞	44
	引用文献	45

## 諸 言

日本における癌の罹患患者数と死亡数は、人口の高齢化を主な要因として、ともに増加し続けている。国立がん研究センターの統計によると、1985年には33.2万人であった癌罹患患者数は、2018年には98.1万人であり、30年余りで約3倍の増加が認められたことが報告されている。一方で、高齢化の影響を除いた年齢調整率でみると、癌の罹患患者数は2010年前後まで増加し、その後は横ばいとなった。人口10万人あたりの死亡数は、1995年に157.8人まで増加しピークを迎えた後に減少傾向となり、2019年には112.4人まで減少している。加えて、癌患者の生存率は多くの癌種で上昇傾向にあると報告されている[1]。その理由として、癌の「早期発見・早期治療」によるものと、新たな治療法の開発による「癌との共生」が高まってきていることが考えられる。免疫チェックポイント阻害剤をはじめとした画期的な抗癌剤の開発に加えて、遺伝子診断に基づく患者個々に合わせた治療法の選択が可能となってきたことがその要因であるといえる。しかし、従来型の殺細胞性抗癌剤が不要となったわけではなく、その使用は多くの癌種において現在も続けられている。

抗癌剤誘発性脱毛症（CIA, chemotherapy-induced alopecia）（図1）は、殺細胞性抗癌剤を投与した際に生じる副作用であり、生活の質を大幅に低下させる要因のひとつである[2, 3]。また、約半数の患者は、脱毛による外見の変化が最も苦痛な副作用であると挙げている[4]。特に女性においては、脱毛の精神的苦痛は計り知れない。即ち、女性患者の脱毛は化学療法を継続する意欲を低下させ[3]、約58%の患者が最も辛い副作用として挙げ[5]、約8%の患者が化学療法を拒否すること[6]などが報告されている。さらに、2013年がん体験者の悩みや負担等に関する実態調査[7]によると、乳癌患者において、CIAは2003年に実施された第一次調査から2013年の第二次調査の両結果にわたり、副作用における悩みの第1位であることが報告されている。

CIAを生じやすい抗癌剤として、アルキル化薬に分類されるイホスファミドおよびシクロホスファミド、アントラサイクリン系に分類されるドキソルビシン、エピルビシンおよびアムルビシン、微小管阻害薬に分類されるドセタキセル、パクリタキセルおよびビンクリスチン等が挙げられる。加えて、抗癌剤は単独での使用のみではなく、数種類の薬剤を組み合わせたレジメンに従い投与されることで、脱毛の発生率は増加する。特に女性に用いる乳癌や卵巣癌のレジメンは脱毛頻度が高い。代表的なレジメンの脱毛頻度は以下のように報告されている。AC療法（ドキソルビシン+シクロホスファミド）で92.4%[8]、FEC療法（エピルビシン+シクロホスファミド+フルオロウラシル）で90%[9]およびTC療法（パクリタキセル+カルボプラチン）で98.9%[10]などである。加えて、渡辺ら[11]によると、99.8%の乳癌患者が抗癌剤治療により脱毛がみられたことを報告し

ている。これらの背景から、CIA を抑制・治療する方法の構築には、臨床からの強い要請がある。

1970 年代初頭から、CIA の予防を目的とした臨床研究が行われてきた。頭皮への血流減少を期待したターニケットによる血流遮断を利用した検討 [12]、頭皮の血管収縮による血流減少と冷却による毛包の不活性化により、治療の影響を受けにくくすることを目的とした頭皮冷却法が用いられてきた [13]。後者においては、1970 年代以降に 30 以上の臨床試験が実施され、それらの結果をもとに、2015 年に米国食品医薬品局 (FDA) は、化学療法による脱毛に対する 2 種類の頭皮冷却装置システムを承認した [14]。

乳癌患者を対象にした国内の臨床試験において、頭皮冷却装置システムを使用した 30 名の患者のうち 8 名 (26.7%) が、「50%未満の脱毛でウィッグは不要」と 2 人の医師に判定され、その結果をもとに、日本においても、2019 年 3 月 30 日に医療機器として承認され、同年 7 月より限られた医療機関で使用されている [15]。しかし、設備導入費用が高額であること、繁雑な手順が必要となること、加えて、化学療法薬や用量の組み合わせにより成功率は異なり、頭皮温度や冷却時間、頭皮冷却装置の適切な取り付け方によっても効果にばらつきが生じることが報告されている [16]。成功率の報告には、16%から 66.3%までのばらつきがあり、現状では一般的な予防法として確立されていない [17]。

近年の報告では、抗酸化物質が化学療法誘発毒性を軽減させる優れた効果を示す可能性が報告されている [18]。Charles ら [19, 20] は、抗酸化物質を同時に投与することで、化学療法を妨害せず、細胞毒性効果を高め、正常組織を保護することにより生存率と治療効果を高めることを報告している。CIA に関しても同様に、抗酸化物質の使用により抑制効果を認めたとの報告もある [21]。この効果の機序として、アポトーシスの抑制効果によるものと推測されている。CIA の原因のひとつには、毛母細胞のアポトーシスが関与していることが報告されている [22, 23]。また、化学療法によって生成されるフリーラジカルやその他の活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) を排除することにより、細胞の損傷を抑制できることも報告されている [18]。これらの報告をもとに、本研究では、幅広い抗酸化活性を有することが知られているエダラボン (EDR, edaravone) に着目した [24, 25]。EDR は酸化力の強い多くのフリーラジカルの作用を減弱する作用が認められており、実臨床においては脳梗塞急性期の患者に用いるフリーラジカルスカベンジャーとして上市されている。その後、筋萎縮性側索硬化症 (ALS, amyotrophic lateral sclerosis) の進行を抑制する作用が認められ、世界的な注目を集めている [26]。しかし、重篤な腎機能障害があらわれたとの報告により、緊急安全性情報が発出された経緯がある。その後、重篤な腎機能障害のある患者には投与しないこと。および、腎機能障害、肝機能障害

又は心疾患のある患者には慎重に投与すること。などの記載が添付文書に追加された。本研究では、EDR の抗酸化作用に着目し、CIA に対する抑制効果について調べた。

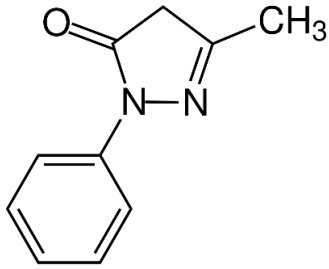
癌化学療法中の患者には、前述の臓器障害が少なからず存在することも懸念され、全身性の有害事象の発現を防止することを目的に、可能な限り局所のみで効果が期待できる投与方法として、外用薬を調製し塗布する方法を選択した。経皮吸収性を左右する重要な要因として、分子量、脂溶性および融点の 3 つの条件が挙げられる。分子量は薬剤の皮膚内への拡散に影響を与える因子であり、薬剤の皮膚透過は分子量が 500 以下であり、より小さい方が速やかである [27]。また、皮膚の角質層は脂溶性が高く、脂溶性が高い薬剤の方がより経皮吸収性が高まるとされている。さらに角質層に対する溶解度が高いほど、経皮吸収性は向上するが、その溶解度は融点と負の相関にあるため、一般的に融点は 200°C 以下が適当であると報告されている [28]。今回使用する EDR (図 2) は、低分子量 (174.20 g/mol) で、かつ、高い脂溶性が報告されている [29]。また融点は 127 ~131°C であり、経皮吸収性に関わる 3 つの条件を全て満たしている薬剤である。

本研究では、シクロホスファミド (CPA ; cyclophosphamide) 誘発性の CIA による QOL の低下を抑制し、化学療法の継続意欲を低下させることなく化学療法の完遂に資することを目的として、1) CPA 誘発脱毛に対するエダラボン軟膏の抑制効果、および 2) CPA 誘発脱毛に対するエダラボンローションの抑制効果について、CIA モデルラットを用いて調べた。以下、本研究で得られた結果を 2 章に渡って論述する。



図1 抗癌剤誘発性脱毛症 (CIA, chemotherapy induced alopecia)

[出典: Sook JY., Seong JK., 2007. Hair loss pattern due to chemotherapy-induced anagen effluvium: a cross-sectional observation. *Dermatology*. 215, 36-40. Fig. 3]



一般名 : エダラボン (Edaravone)  
 化学名 : 5-Methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one  
 分子量 : 174.20  
 分子式 :  $C_{10}H_{10}N_2O$   
 外観 : 白色～微黄白色の結晶又は結晶性の粉末  
 溶解性 : 酢酸, メタノール, エタノール (99.5) に  
 溶解やすく, 水に溶けにくい.  
 融点 : 127～131 °C

図2 エダラボンの構造と物理化学的性質

略号

ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell leukemia protein-2
CIA	Chemotherapy-induced alopecia
CPA	Cyclophosphamide
EDR	Edaravone
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
i. p.	Intraperitoneal injection
QOL	Quality of life
ROS	Reactive Oxygen Species

## 第1章 CPA誘発脱毛に対するエダラボン軟膏の抑制効果

### 1.1. 背景・目的

緒言に記述したように、CIAは生活の質を大幅に低下させる要因の1つであるが、その予防方法は確立していない[30, 31]。特に女性では、脱毛に対する精神的苦痛は計り知れず、それはしばしば化学療法による治療を継続する意欲を低下させる[31]。CIAを予防する方法として、頭皮への血流を減少させ、化学療法による毛包へのダメージを抑える頭皮冷却法が臨床的に用いられている[13]。しかし、操作の繁雑さと設備導入費用が高額であること、さらに効果が限定的といった理由により、一般的な予防方法としては確立されていない[17]。また、壮年性脱毛症に用いるミノキシジルや[32]、強い抗酸化作用を有するビタミンD製剤のカルシトリオール<sup>®</sup>の局所投与[33]および $\alpha$ トコフェロールの経口投与[34]などによる検討もなされているが、これらの薬剤ではCIAの抑制効果は示されていない。

近年になり、新規の抗酸化物質がCIAの予防に効果的であることが報告されている[21]。抗酸化物質は、化学療法によって生成されるフリーラジカルやその他の活性酸素種(ROS)と反応し、それらを排除することにより、細胞の損傷を防ぐことが報告されている[18]。

本章では、抗酸化物質としてエダラボン(EDR, edaravone)を用いて、CIA抑制効果を調べることを目的とした。即ち、CIAモデルラットを用いてEDRの外用療法によるCIA抑制効果を調べた。

### 1.2. 方法

#### 1.2.1. 実験動物

Wistar系ラット(3週齢, 雄性)は、日本エスエルシー株式会社(静岡)から購入した。ラットは、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度47~67%、明暗サイクル12時間の環境下で飼育し、餌(RCF-1(オリエンタル酵母工業株式会社, 東京))および水は自由摂取とした。なお、本研究は摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した。

許可番号: K19-16, K20-19

#### 1.2.2. CIAモデルラットの作製

Onaolapoら[35]の方法を参考に、CIAモデルラットを作成した。即ち、day 0に吸入麻酔薬のイソフルラン(富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)を気化器により供給し、正向反射の消失を確認した後、背部の毛を脱毛ワックス(moofee<sup>®</sup>, 株式会社フラットヒル, 札幌)により脱毛し、成長期の毛を誘導した。day 9に



除毛クリーム (SORANSIA®, Fine Chemetics, 東京) により除毛した後, 75 mg/kg のシクロホスファミド (CPA; 注射用エンドキサン, 塩野義製薬株式会社, 大阪) を単回腹腔内投与した.

### 1.2.3. 実験プロトコル

Wistar 系ラット (3 週齢, 雄性) の背部の毛を成長期に誘導した後, 以下の 4 群に分け, EDR 軟膏の効果を調べた (図 3). なお, それぞれの群は半数ずつに分け, 観察期間を day 16 および day 21 までとした.

1) Control 群: 軟膏基剤塗布

(観察期間 day 16 (n=5), 観察期間 day 21 (n=5))

2) EDR 0%群: CPA 75 mg/kg i.p. および 軟膏基剤塗布

(観察期間 day 16 (n=5), 観察期間 day 21 (n=5))

3) EDR 3%群: CPA 75 mg/kg i.p. および 3% EDR 軟膏塗布

(観察期間 day 16 (n=5), 観察期間 day 21 (n=5))

4) EDR 30%群: CPA 75 mg/kg i.p. および 30% EDR 軟膏塗布

(観察期間 day 16 (n=5), 観察期間 day 21 (n=5))

なお, CPA は 1 回のみ腹腔内投与した. また, EDR 軟膏の調製には, 軟膏基剤 (流動パラフィン (丸石製薬株式会社, 大阪) を白色ワセリン (丸石製薬株式会社) と混和し, 流動パラフィンを 10 w/w%としたもの) を用い, EDR (3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)) を 3% および 30% の濃度となるよう混合した. 軟膏基剤および各濃度の EDR 軟膏は, day 9 から屠殺前日まで 1 日 1 回塗布した. なお, 各軟膏の塗布期間は, 観察期間が day 16 の 4 群では day 15 まで, 観察期間が day 21 の 4 群は day 20 までとした. 塗布量は, 背部皮膚の 2×3 cm あたり 100 mg/回とした.

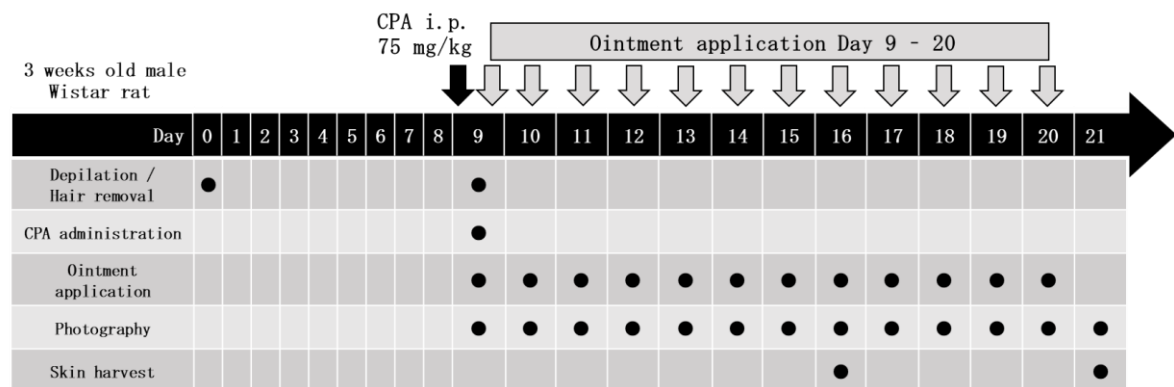


図3 実験プロトコル

Wistar系ラット（3週齢，雄性）の背部皮膚を day 0 に脱毛し，成長期の毛を誘導した．Control 群（n=10，軟膏基剤塗布），EDR 0% 群（n=10，CPA 75 mg/kg i.p. および軟膏基剤塗布），EDR 3% 群（n=10，CPA 75 mg/kg i.p. および 3% EDR 軟膏塗布），EDR 30% 群（n=10，CPA 75 mg/kg i.p. および 30% EDR 軟膏塗布）に分けた．Day 9 に背部皮膚を除毛後，CPA（75 mg/kg i.p.）を単回腹腔内投与した．同日から屠殺前日（day 15 あるいは day 20）まで 1 日 1 回軟膏基剤または各濃度の EDR 軟膏を塗布した．写真撮影を 1 日 1 回行い，day 16（n=5）あるいは day 21（n=5）に屠殺後，背部皮膚を採取した．

#### 1.2.4. 被覆率の評価

背部皮膚の被覆率は，day 0 から day 16 あるいは day 21 まで 1 日 1 回評価した．背部皮膚のマーキング領域（2×3 cm）の内側を評価対象とし，盲検化した後に，3 名の観察者によって被覆率をスコア化した．被覆率のスコア化には Hagiwara ら [21] の方法を参考に，被覆率の程度に合わせ以下の 5 段階に定義した．0：0%の被覆率，1：約 25%の被覆率，2：約 50%の被覆率，3：約 75%の被覆率，4：100%の被覆率（図 4）．3 名のスコアの平均値を算出し，その結果を各個体の被覆率とした．






スコア	0	1	2	3	4
被覆率	0%	25%	50%	75%	100%
					

図 4 被覆率スコアの定義

背部皮膚のマーキング領域（2×3 cm）の内側を評価対象とし，被覆率の程度（0：0%の被覆率，1：約 25%の被覆率，2：約 50%の被覆率，3：約 75%の被覆率，4：100%の被覆率）により，被覆率スコアを 5 段階に定義した．

#### 1.2.5. 皮膚の採取

ラットにメデトミジン（ドミツール®，日本全薬工業株式会社，福島）0.15 mg/kg，ミダゾラム（武田テバファーマ株式会社，愛知）2.0 mg/kg および酒石酸ブトルファノール（ベトルファール®，Meiji Seika ファルマ株式会社，東京）2.5 mg/kg を腹腔内投与し，正向反射がないことを確認した後，各個体の脱毛部の表皮から真皮までを採取した．4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液，pH7.0（富士フィルム和光純薬工業株式会社，大阪）中，4°Cに設定した冷蔵庫で終夜静置した．

#### 1.2.6. 皮膚組織切片の作製

1.2.5 で採取した皮膚組織を，以下の手順で脱脂した．予め，100%エタノールを入れたバイアル瓶に入れ 1 時間振盪し，これを 3 回繰り返した後，4°Cで一夜静置した．静置後，100%メタノールを入れたバイアル瓶に皮膚組織を移し 1 時間浸漬した後，100%メタノールとクロロホルムを 1：2 の割合で入れたバイアル瓶に移し，5 時間振盪した．次に，100%メタノールを入れたバイアル瓶に

移し1時間振盪し、続いて、100%エタノールを入れたバイアル瓶に移し1時間振盪した。皮膚組織は1.0×0.5 cmの大きさにトリミングした後、tissue cassette (Greiner Bio-One, Germany) に入れ、自動固定包埋装置 (Cell & Tissue Processor CT-Pro20, ジェノスタッフ株式会社, 東京) を用いて浸透した。浸透が完了した皮膚組織をパラフィン伸展機 (EC-4030, アズワン株式会社, 大阪) 上でパラフィンを予め流し込んでおいたベースモールドに移し、tissue cassette を載せてパラフィンを流し込み包埋した。パラフィンが固まるまで室温に放置し、その後、4°Cに設定した冷蔵庫で一夜静置した。次に、パラフィンブロックをベースモールドから取り出し、マイクロトーム (ROM-380, 大和光機工業株式会社, 埼玉) を用いて、3 μmに薄切した。薄切した組織を、40°Cに設定した湯浴 (EWS-100RD, アズワン株式会社, 大阪) に移し、組織が元の大きさになるまで伸展させた。続いて、MAS コート付きスライドガラス (S9442, 松浪硝子工業株式会社, 大阪) 上に伸展させた組織を載せた。余分な水分を取り除いた後、45°Cに設定したパラフィン伸展機上で2時間静置し、乾燥した。

#### 1.2.7. 毛包面積の評価

毛包面積は、Hematoxylin-Eosin 染色によって染色した組織を用いて評価した。即ち、組織切片をキシレン層 (2層)、100%エタノール層 (2層) および70%エタノール層に各5分間ずつ順に浸し、パラフィンを除去した。4分間流水で洗浄した後、マイヤーヘマトキシリン溶液 (富士フィルム和光純薬株式会社) 層で10分間核染色し、15分間流水で洗浄した。続いて、エオシン溶液層で2分間細胞質染色し、5秒間流水で洗浄した。続いて、70%エタノール、80%エタノールおよび90%エタノール層の順に、それぞれ3回、5回および10回浸した後、100%エタノール層 (3層) に20回浸し、脱水した。キシレン槽 (4層) に各15回浸し、透徹した。最後に、カナダバルサム (富士フィルム和光純薬株式会社) で封入し、顕微鏡 (BZ-X810, 株式会社キーエンス, 大阪) で検鏡し、毛包を撮影した。続いて、染色された毛包領域を BZ-X800 Analyzer (株式会社キーエンス) を用いて抽出し、毛包面積を算出した。なお、個体ごとに25 μm間隔で3枚の皮膚切片から各3視野、計9視野の毛包面積を算出し、その平均値を統計解析に使用した。

#### 1.2.8. mRNA 発現量の評価

1.2.5. と同様に表皮から真皮までを5×5 mm採取し、RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific 株式会社, 東京) 中に4°Cで一晩浸漬した。その後、液体窒素を用いて凍結し、ビーズ破砕機 (μT-12, タイテック株式会社, 埼玉) を用いて粉砕し、フェノール・クロロホルム法により total RNA を

調製した。すなわち、粉砕した皮膚組織に 400  $\mu\text{L}$  の 4 M-GTC を加えた後、ボルテックスで十分混和した。次に、遠心機 (CF16RX, エッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ株式会社, 茨城) で, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離した。上清 200  $\mu\text{L}$  を予め 100  $\mu\text{L}$  の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0), 300  $\mu\text{L}$  の水飽和フェノールおよび 200  $\mu\text{L}$  のクロロホルムを入れたオートクレーブ滅菌済みポリプロピレン製チューブに入れ, 20~30 秒間縦に振り十分混和した。次に, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離した。上層を予め 100  $\mu\text{L}$  の 2 M 酢酸ナトリウム (pH 4.0), 300  $\mu\text{L}$  の水飽和フェノールおよび 200  $\mu\text{L}$  のクロロホルムを入れたオートクレーブ滅菌済みポリプロピレン製チューブに移し, 20~30 秒間縦に振り十分混和した。再び, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離し, 上層をオートクレーブ滅菌済みポリプロピレン製チューブに移し, ピペットマンでボリュームを測定した。そこへ予め氷中で冷却しておいた 2-プロパノールを測定したボリュームの 0.8 倍量加え, 混和した後に氷上で 30 分間放置した。放置後, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心し, RNA を沈殿させ, 上清をデカンテーションおよびピペットマンで取り除いた。沈殿した RNA に氷中で冷却しておいた 75%エタノールを 1 mL 加え, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心し, RNA を洗浄した。上清をデカンテーションおよびピペットマンで取り除き, 得られた RNA の沈殿を減圧下約 5 分間乾燥した。乾燥した RNA に, 25  $\mu\text{L}$  の注射用蒸留水, 20  $\mu\text{L}$  の 25 mM 塩化マグネシウム水溶液, 0.5  $\mu\text{L}$  の RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  の DNase I (5 U/ $\mu\text{L}$ ) および 2.5  $\mu\text{L}$  の 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加え, 37 $^{\circ}\text{C}$  の湯浴で 30 分間反応させた。次に, 50  $\mu\text{L}$  の注射用蒸留水および 100  $\mu\text{L}$  のフェノール/クロロホルム液 (1:1) を加え, 13,000 $\times$ g, 室温, 5 分間遠心分離し, 上層をオートクレーブ滅菌済みポリプロピレン製チューブに移し, 10  $\mu\text{L}$  の 3 M 酢酸ナトリウムおよび予め氷中で冷却しておいた 100%エタノールを 250  $\mu\text{L}$  加え, -80 $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間静置した。続いて, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心分離し, RNA を沈殿させ, 上清をデカンテーションおよびピペットマンで取り除いた。さらに, 沈殿した RNA に氷中で冷却しておいた 70%エタノールを 700  $\mu\text{L}$  加え, 13,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離し, RNA を洗浄した。上清をデカンテーションおよびピペットマンで取り除き, 得られた RNA の沈殿を減圧下約 5 分間乾燥した。乾燥した RNA に 20  $\mu\text{L}$  の注射用蒸留水を加え, これを total RNA とした。

次に, High Capacity RNA-to-cDNA<sup>TM</sup> KIT (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いて, cDNA を調製した。

続いて, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を用いて IGF-1 (Rn00710306\_m1), Bcl-2 (Rn99999125\_m1) および Bax (Rn01480161\_g1) の mRNA 発現量を Step One<sup>TM</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により定量した。

#### 1.2.9. Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の算出

1.2.8. で得られた Bcl-2 mRNA 発現量と Bax mRNA 発現量をもとに算出した.

#### 1.2.10. 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差 (SD) で示した. 統計学的有意差は Mann-Whitney  $U$  検定で解析し,  $P < 0.05$  を有意差ありとした. 全ての統計解析は, R (The R Foundation for Statistics Computing, Australia) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (埼玉医療センター, 自治医科大学, 埼玉) を用いた.

### 1.3. 結果

#### 1.3.1. EDR 軟膏塗布による被覆率スコアに及ぼす効果

CPA 誘発脱毛に対する EDR 軟膏の抑制効果を調べるため、CIA を誘導したラット（脱毛（day 0）後に成長期毛包を誘導した後、CPA（75 mg/kg）を投与し化学療法誘発脱毛を誘導したモデル）に、CPA 投与と同日（day 9）より EDR 軟膏（0%、3%または 30%）による治療を開始した。なお、各群の 10 個体中 5 個体の観察期間を day 16 までとし、残りの 5 個体の観察期間を day 21 までとした。観察期間の各個体の外観写真を盲検化し、3 名個別に評価した。その 3 名のスコアから算出した被覆率スコアを用いて、EDR 軟膏の脱毛抑制効果を調べた（図 5a, b および c）。その結果、day 14 では全個体の被覆率スコアの平均は  $4.0 \pm 0.0$  であった。Control 群においては、観察期間を通して脱毛は認められず、最終観察日まで被覆率スコアは  $4.0 \pm 0.0$  であった。CPA を投与した 3 群においては、day 15 以降、被覆率スコアの低下を認め、day 16 の EDR 0%群、EDR 3%群および EDR 30%群の被覆率スコアは、それぞれ  $3.1 \pm 0.2$ 、 $3.5 \pm 0.1$  および  $3.4 \pm 0.1$  であった。その後、day 18 まで低下がみられ、EDR 0%群、EDR 3%群および EDR 30%群の被覆率スコアは、それぞれ  $0.7 \pm 0.6$ 、 $1.9 \pm 0.8$  および  $1.7 \pm 0.7$  であった。最終観察日の day 21 の各群の被覆率スコアは、それぞれ  $4.0 \pm 0.0$  (control 群)、 $0.6 \pm 0.4$  (EDR 0%群)、 $1.7 \pm 0.8$  (EDR 3%群) および  $1.6 \pm 0.5$  (EDR 30%群) であり、control 群と比較して CPA を投与した 3 群では、有意な脱毛がみられた。一方、EDR 3%群および 30%群では、有意な差はみられなかったが、EDR 0%群と比較して脱毛の予防傾向がみられた。

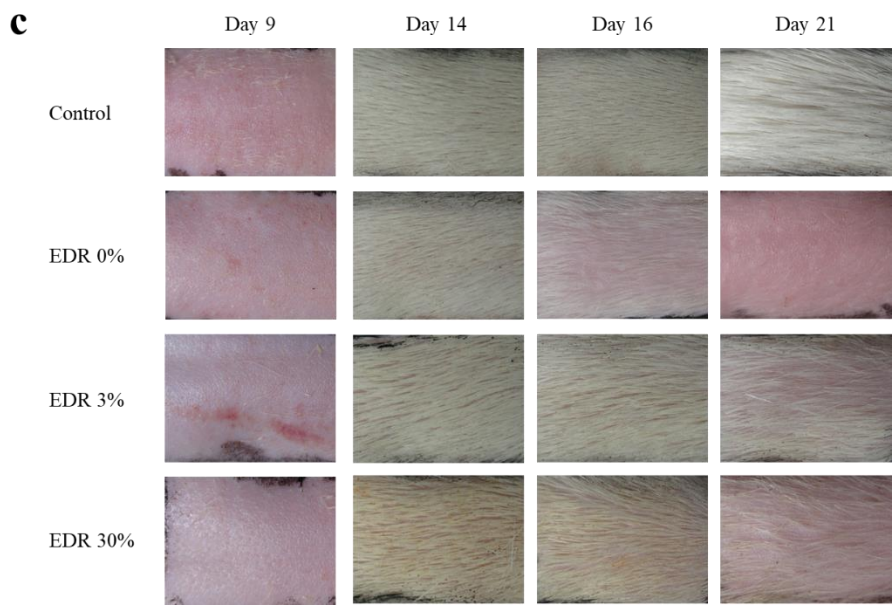
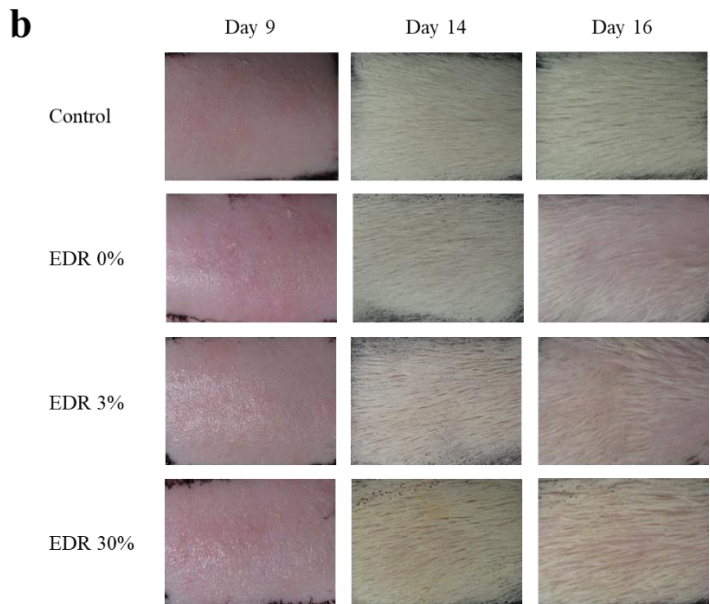
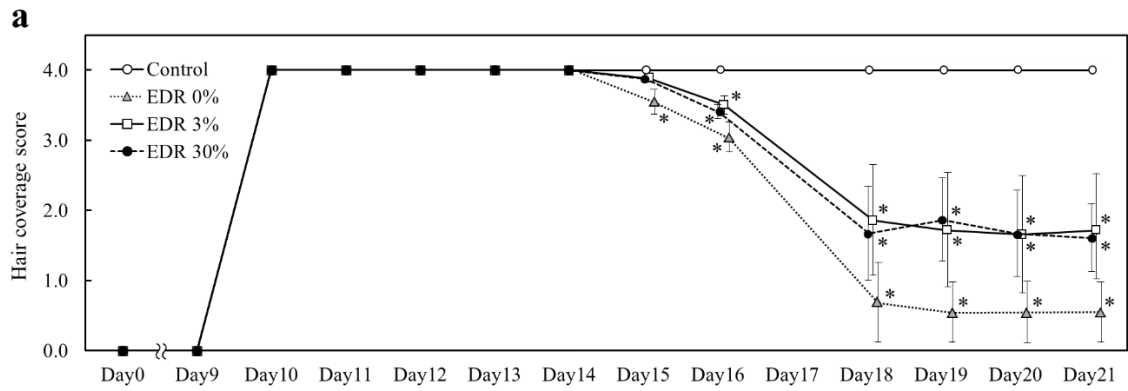




図5 EDR 軟膏塗布による被覆率スコアの推移および背部皮膚の代表的な個体の外観写真

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した。Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した。同日よりエダラボン (EDR) 軟膏 (0%, 3% または 30%) による治療を開始し, day 16 あるいは day 21 まで治療した。即ち, EDR 0% 群 (n=10), EDR 3% 群 (n=10) および EDR 30% 群 (n=10) には, それぞれの濃度の EDR 軟膏を 1 日 1 回塗布した。なお, 各群の 10 個体中 5 個体の観察期間を day 16 までとし, 残りの 5 個体の観察期間を day 21 までとした。被覆率スコア (a) は, 各個体の外観写真を盲検化し, 3 名個別に評価した。その 3 名のスコアから平均値 + 標準偏差 (SD) を算出した。なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした。

加えて, 観察期間 day 16 (b) および観察期間 day 21 (c) の, 背部皮膚のマーキング領域 (2×3 cm) の除毛直後 (day 9) と CIA 発現の直前 (day 14) および各観察期間の皮膚採取直前 (day 16 および day 21) の各群の代表的な個体の外観写真を示した。

### 1.3.2. EDR 軟膏塗布による毛包面積に与える影響

各濃度の EDR 軟膏塗布による毛包面積の変化を調べるため, day 16 および day 21 に採取した皮膚切片の Hematoxylin-Eosin 染色画像から毛包面積を算出した (図 6a, b, c および d) . 各群の代表的な個体の Hematoxylin-Eosin 染色画像と, 毛包面積の結果を, 観察期間ごとに day 16 (図 6a, c) および day 21 (図 6b, d) に示した. Day 16 の毛包面積は, それぞれ,  $0.118 \pm 0.013 \text{ mm}^2$  (control 群) ,  $0.077 \pm 0.006 \text{ mm}^2$  (EDR 0%群) ,  $0.114 \pm 0.004 \text{ mm}^2$  (EDR 3%群) および  $0.107 \pm 0.006 \text{ mm}^2$  (EDR 30%群) であった. EDR 3%群および EDR 30%群の毛包面積は, EDR 0%群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ) . さらに, EDR 3%群および EDR 30%群の毛包面積は, 脱毛のみられなかった control 群と同程度であった. Day 21 の毛包面積は, それぞれ,  $0.073 \pm 0.010 \text{ mm}^2$  (control 群) ,  $0.089 \pm 0.010 \text{ mm}^2$  (EDR 0%群) ,  $0.093 \pm 0.004 \text{ mm}^2$  (EDR 3%群) および  $0.105 \pm 0.007 \text{ mm}^2$  (EDR 30%群) であり各群間で有意な差は認められなかった. Day 16 から day 21 にかけて control 群の毛包面積の値に低下傾向が認められた.

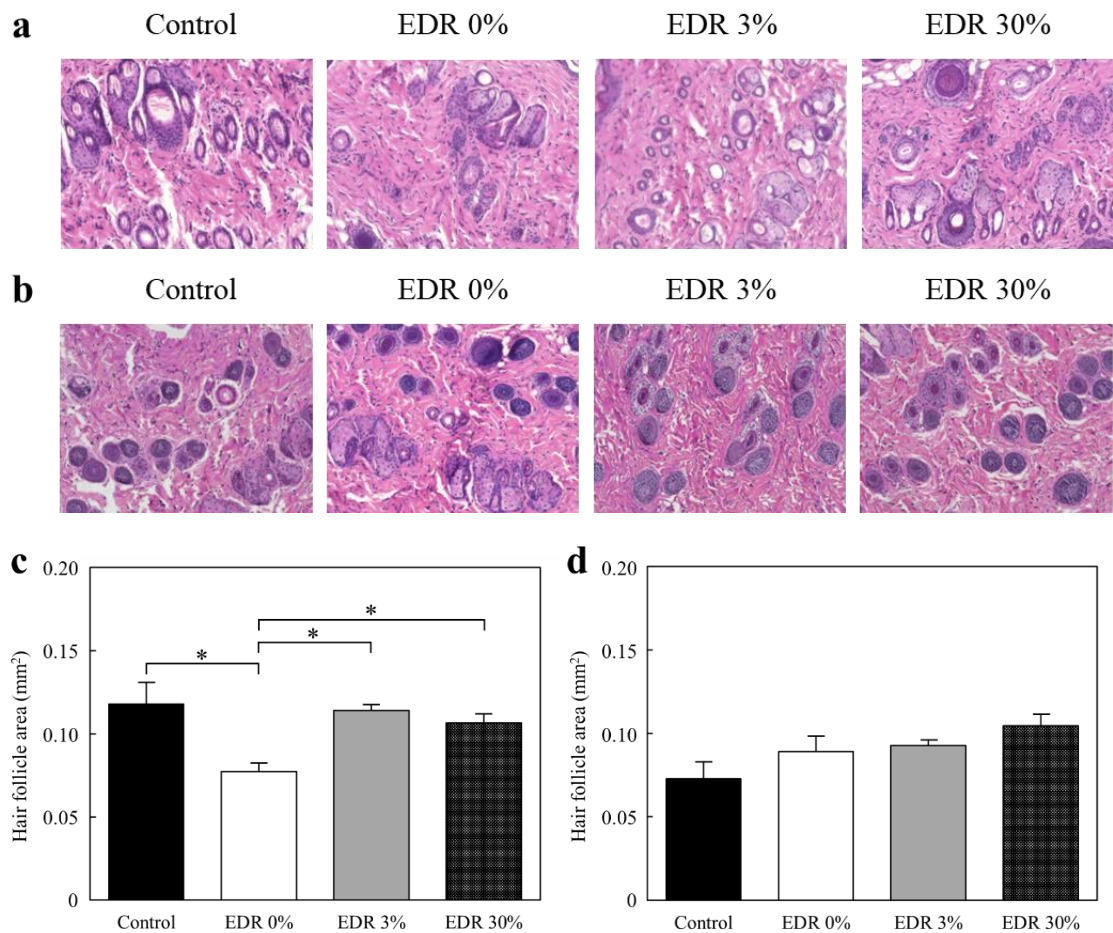


図 6 各観察期間における背部皮膚組織の Hematoxylin-Eosin 染色画像と毛包面積の値

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した。Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した。同日よりエダラボン (EDR) 軟膏 (0%, 3%, または 30%) による治療を開始し, day 16 あるいは day 21 まで治療した。即ち, EDR 0% 群 (n=10), EDR 3% 群 (n=10) および EDR 30% 群 (n=10) には, それぞれの濃度の EDR 軟膏を 1 日 1 回塗布した。なお, 各群の 10 個体中 5 個体の観察期間を day 16 までとし, 残りの 5 個体の観察期間を day 21 までとした。最終観察日に採取した背部皮膚に対し Hematoxylin-Eosin 染色を行い, BZ-X800 Analyzer を用いて毛包面積を算出した。各観察期間 day 16 (a) および day 21 (b) の代表的な Hematoxylin-Eosin 染色画像を示した。加えて, 各観察期間 day 16 (c) および day 21 (d) の毛包面積の平均値±標準偏差 (SD) を算出した。なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした。

### 1.3.3. 背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量に対する EDR 軟膏の効果

IGF-1 は、成長期の毛髪の成長と細胞増殖の主要な調節因子である[36]。加えて、毛包の成長期を維持すること、減少により成長期の毛包が退行期へと移行することが報告されている[37]。そこで、EDR 軟膏が毛包の増殖、毛周期および毛包の分化に関与する IGF-1 の発現に影響を与えるか否かを調べるため、背部皮膚組織の IGF-1 の mRNA 発現量を調べた。即ち、各観察期間後に採取した背部皮膚組織を用いて IGF-1 mRNA 発現量を定量した(図 7)。Day 16 (図 7a) の EDR 0%群の IGF-1 mRNA 発現量は、 $0.21 \pm 0.12$  であり、control 群 ( $1.00 \pm 0.22$ ) と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ )。一方、EDR 3%群および EDR 30%群の IGF-1 mRNA 発現量は、それぞれ、 $1.05 \pm 0.18$  および  $1.07 \pm 0.44$  であり、control 群と同等レベルに維持されていた。特に、EDR 3%群では EDR 0%群と比較して有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。EDR 30%群では、有意な差はみられなかったものの、EDR 0%群と比較して IGF-1 mRNA の発現量は高い傾向を示した ( $P = 0.066$ )。

Day 21 (図 7b) の EDR 0%群の IGF-1 mRNA 発現量は、 $0.26 \pm 0.11$  であり、control 群 ( $1.00 \pm 0.24$ ) と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ )。一方、EDR 3%群および EDR 30%群の IGF-1 mRNA 発現量は、それぞれ、 $0.50 \pm 0.09$  および  $0.44 \pm 0.10$  であり、control 群よりも低値ではあるものの、有意な差はみられなかった。加えて、EDR 3%群および EDR 30%群の IGF-1 mRNA 発現量は、EDR 0%群と比較して有意な差はみられなかったものの、高い傾向を示した。

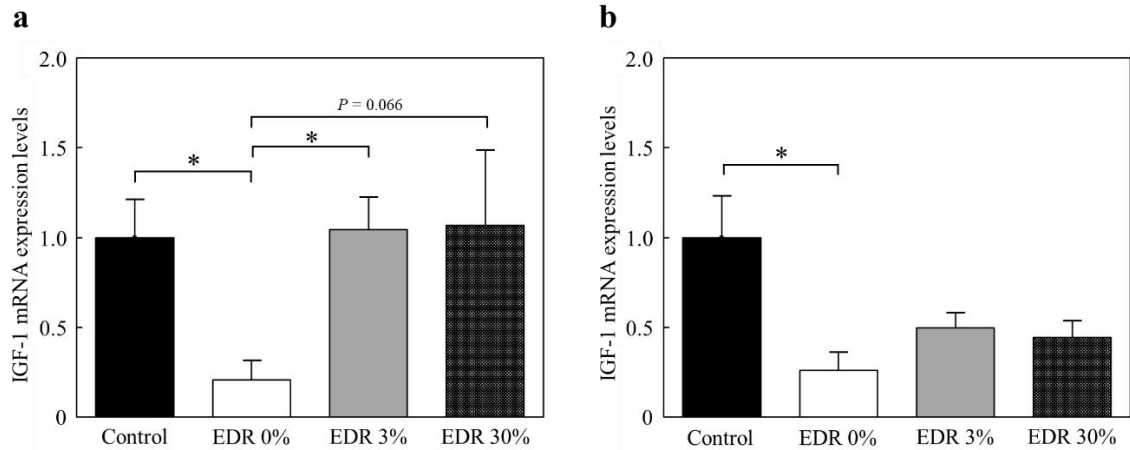


図7 各観察期間における背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量の比較

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した. Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した. 同日よりエダラボン (EDR) 軟膏 (0%, 3% または 30%) による治療を開始し, day 16 あるいは day 21 まで治療した. 即ち, EDR 0% 群 (n=10), EDR 3% 群 (n=10) および EDR 30% 群 (n=10) には, それぞれの濃度の EDR 軟膏を 1 日 1 回塗布した. なお, 各群の 10 個体中 5 個体の観察期間を day 16 までとし, 残りの 5 個体の観察期間を day 21 までとした. 最終観察日に採取した背部皮膚組織 (表皮から真皮) における IGF-1 mRNA 発現量を, real-time RT-PCR 法によって定量した. 各観察期間 day 16 (a) および day 21 (b) の IGF-1 mRNA 発現量の平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した. なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

#### 1.3.4. 背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA および Bax mRNA 発現量に対する EDR 軟膏の効果

癌化学療法によって生じる脱毛には毛包細胞のアポトーシスの関与が報告されている [22, 23]. そこで, EDR 軟膏がアポトーシスに関与する Bcl-2 (アポトーシス阻害タンパク質) および Bax (アポトーシス促進タンパク質) の発現に与える影響を調べるため, 各観察期間後に採取した背部皮膚組織を用いて Bcl-2 および Bax の mRNA 発現量を定量した.

Day 16 (図 8a) の EDR 0%群の Bcl-2 mRNA 発現量は,  $0.17 \pm 0.07$  であり, control 群 ( $1.00 \pm 0.32$ ) と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ ). 一方, EDR 3%群および EDR 30%群の Bcl-2 mRNA 発現量は, それぞれ,  $0.75 \pm 0.12$  および  $0.83 \pm 0.31$  であり, control 群と同等レベルに維持されていた. 特に, EDR 3%群では, EDR 0%群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ). Bax mRNA 発現量についても同様の傾向がみられた (図 8b). 即ち, EDR 0%群の Bax mRNA 発現量は  $0.14 \pm 0.03$  であり, control 群 ( $1.00 \pm 0.49$ ) と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ ). 一方, EDR 3%群および EDR 30%群の Bax mRNA 発現量は, それぞれ,  $0.32 \pm 0.03$  および  $0.34 \pm 0.18$  であり, control 群と比較して低下傾向がみられたが, EDR 0%群の Bax mRNA 発現量は, EDR 3%群と比較して有意な低下がみられた ( $P < 0.05$ ). EDR 30%群でも有意な差はみられなかったものの, EDR 0%群と比較して高値を示した ( $P = 0.067$ ).

Day 21 (図 8c) の EDR 0%群の Bcl-2 mRNA 発現量は,  $0.42 \pm 0.16$  であり, control 群 ( $1.00 \pm 0.19$ ) と比較して低下傾向がみられた. 一方, EDR 3%群および EDR 30%群の Bcl-2 mRNA 発現量は, それぞれ,  $0.76 \pm 0.13$  および  $0.77 \pm 0.32$  であり, control 群と同等レベルに維持されていた. Bax mRNA 発現量についても同様の傾向がみられた (図 8d). 即ち, EDR 0%群の Bax mRNA 発現量は  $0.43 \pm 0.17$  であり, control 群 ( $1.00 \pm 0.27$ ) と比較して低下傾向がみられた. 一方, EDR 3%群および EDR 30%群の Bax mRNA 発現量は, それぞれ,  $0.73 \pm 0.16$  および  $0.63 \pm 0.19$  であり, EDR 0%群と比較して高値を示した.

#### 1.3.5. Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に対する EDR 軟膏の効果

Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の変化が, アポトーシス刺激後の細胞アポトーシスを促進する可能性が示唆されている [38]. そこで, EDR 軟膏が Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に与える影響を調べるため, 各観察期間後に採取した背部皮膚組織から得られた Bcl-2 および Bax の mRNA 発現量から, Bcl-2/Bax mRNA 発現量比を算出した (図 8e, f).

Day 16 (図 8e) の EDR 0%群の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は  $0.61 \pm 0.11$  であり, control 群 ( $1.23 \pm 0.35$ ) と比較して, 有意な差はみられなかったものの,

低下傾向を示した. EDR 3%群およびEDR 30%群の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は, それぞれ,  $1.26 \pm 0.15$ ,  $1.18 \pm 0.47$  であり, control 群と同程度であった. 特に EDR 3%群の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は, EDR 0%群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ ). Day 21 (図 8f) の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は, control 群は  $1.07 \pm 0.10$ , EDR 0%群は  $1.03 \pm 0.16$ , EDR 3%群は  $1.11 \pm 0.12$  および EDR 30%群は  $1.25 \pm 0.05$  であり, 全ての群において同程度であった.

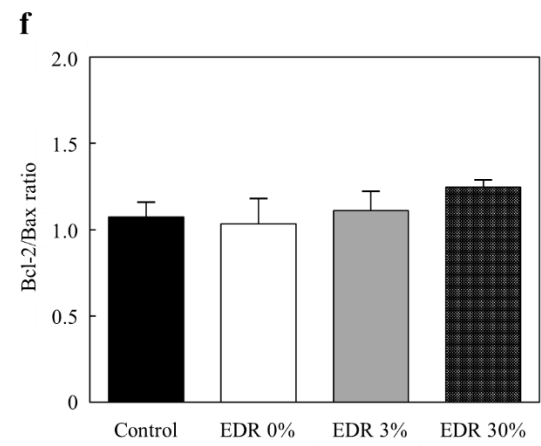
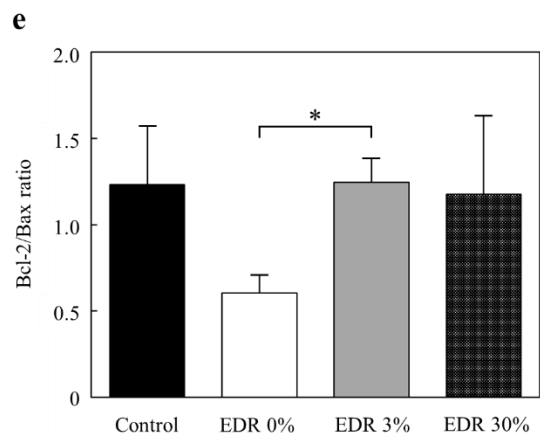
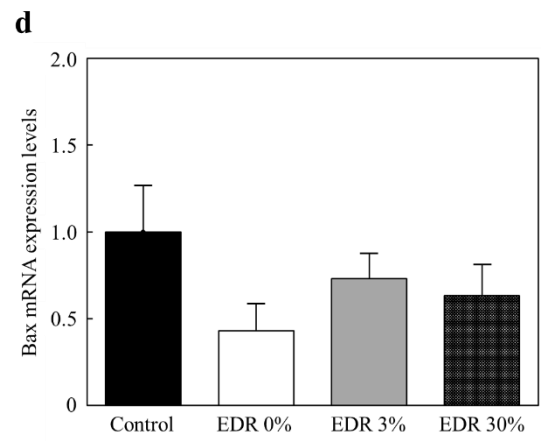
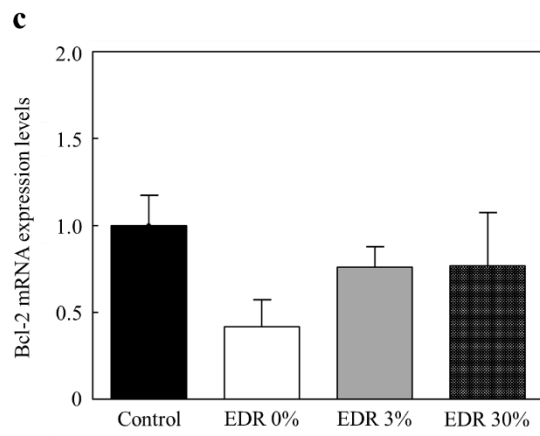
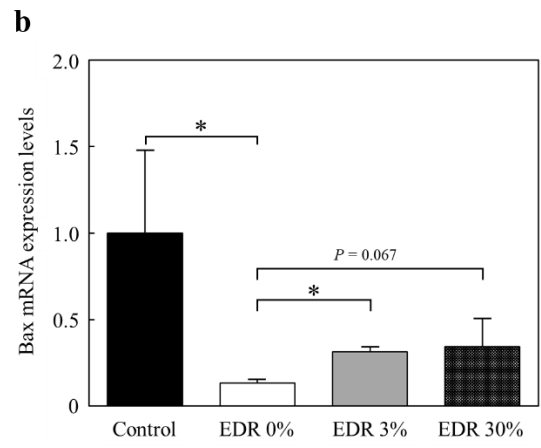
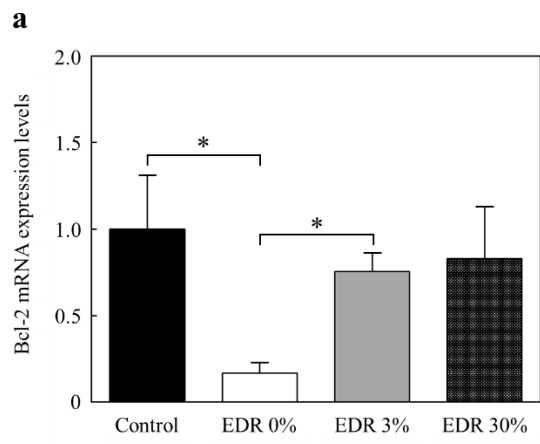




図8 各観察期間における背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA 発現量, Bax mRNA 発現量  
および Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の比較

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した. Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した. 同日よりエダラボン (EDR) 軟膏 (0%, 3% または 30%) による治療を開始し, day 16 あるいは day 21 まで治療した. 即ち, EDR 0% 群 (n=10), EDR 3% 群 (n=10) および EDR 30% 群 (n=10) には, それぞれの濃度の EDR 軟膏を 1 日 1 回塗布した. なお, 各群の 10 個体中 5 個体の観察期間を day 16 までとし, 残りの 5 個体の観察期間を day 21 までとした. 最終観察日に採取した背部皮膚組織 (表皮から真皮) における Bcl-2 mRNA 発現量 (a, c) および Bax mRNA 発現量 (b, d) を, real-time RT-PCR 法によって定量した. 各観察期間 day 16 (a, b) および day 21 (c, d) の Bcl-2 mRNA 発現量および Bax mRNA 発現量の平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した. 加えて, 得られた結果から, 各観察期間 day 16 (e) および day 21 (f) の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した. なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

#### 1.4. 考 察

本章の結果から、CIA に対する EDR 軟膏の脱毛抑制効果が確認された。毛周期は通常、成長期、退行期、休止期の 3 つの段階に分類される (図 9) [39, 40]。CIA は、細胞増殖が活発な成長期の毛包におけるアポトーシスが大量に誘導されることから生じると報告され[41]、成長期の脱毛として認識されている[42]。CIA では、アポトーシスによる損傷を伴う脆弱な毛髪が増加と、小型化された毛包が頻繁に確認される[43]。したがって、アポトーシスの抑制と発毛の促進は、CIA の治療にとって重要であると考えられている[44]。一方、脱毛により、休止期の毛包が成長期の毛包へ変化することが報告されており、通常、8~9 日以内に成熟した成長期の毛包が発達し、新たな毛幹が出現する[45]。これは組織学的、機能的および肉眼的にも、自発的に発達する成長期の毛包と同等であることが報告されている[46]。したがって、本研究で用いた CIA モデル (脱毛後に成長期毛包を誘導した後、CPA を投与し化学療法誘発脱毛を発現させたモデル) は、CIA の研究で広く使用されている。

Paus ら[45]は、8 週齢の動物に 50 mg/kg 以上の CPA を投与することで、脱毛が観察され、150 mg/kg の高用量の CPA の投与により完全な脱毛が発生し、毛包にさらに深刻な損傷を与えることを報告している。加えて、より若い個体においては、低用量の CPA により完全な脱毛が発生することも報告している。本研究で用いた CPA の投与量は 75 mg/kg であり、比較的低用量ではあるが、3 週齢の若いラットにおける EDR 0%群においては、ほぼ完全な脱毛を示した (図 5a)。このことから、本研究で用いた CPA の投与量は、CIA を十分に発現できていると考えられた。

被覆率スコアにおいて、EDR 0%群 ( $0.6 \pm 0.4$ ) と比較して EDR 3%群 ( $1.7 \pm 0.8$ ) および EDR 30%群 ( $1.6 \pm 0.5$ ) はスコアの低下が抑制され、50%程度の毛髪が保持されたことから、EDR による CPA 誘発脱毛の軽減が認められた (図 5a)。また、EDR 30%群の被覆率スコアが EDR 3%群と同程度であったことから (図 5a)、EDR の効果は 3%を超える濃度には依存しないことが示唆された。今後、脱毛抑制効果が得られる EDR 濃度について詳細に調べる必要がある。

CPA による毛包のアポトーシスは、day 10 に最も強く生じることが報告されている[45]。数日後、毛包の損傷過程が進行し、損傷した毛包から脱毛が生じることが、損傷を受けなかった毛包は脱落を免れる。本研究の被覆率スコアの結果から、CPA による毛包の脱落過程は day 18 以前に終了し、その後の被覆率スコアには変化がみられなかったと考えられた。

毛包面積は毛周期の変化と一致し[47]、毛周期は非常に正確な時間軸に従うことが報告されている[48]。即ち、毛包は、脱毛後、成長期に入り約 8 日後に最大となり、その後、縮小に転じ 18 日後には最小となり退行期に入ることが報告

されている。本研究で得られた day 16 の毛包面積の結果は、毛包の縮小段階にあると考えられる。この時点で、EDR 0%群の毛包面積が control 群と比較して有意に低値 ( $P < 0.05$ ) であったことから、CPA による毛包の損傷によって毛包面積の縮小が促進されたと考えられる。さらに、EDR 3%群および EDR 30%群の毛包面積は、EDR 0%群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、EDR 軟膏の塗布により CPA による毛包の損傷が抑制され、脱毛および毛包面積の縮小が抑制されたと考えられる。一方、day 21 の毛包面積は各群間で有意な差はみられなかったが、control 群の毛包面積は小さい傾向が認められた。これは、CPA を投与していない control 群の毛包は休止期にあたることが要因であると考えられる。また、本研究の予備的試験では、CPA を投与した個体では、day 23 頃から発毛が認められた。即ち、CPA を投与した 3 群の day 21 の毛包は、発毛直前の成長期にあたる考えられた。化学療法によって誘発される毛包の損傷は、2 つの異なる経路、即ち、低用量の CPA によって誘発される「ジストロフィー成長期」と高用量の CPA によって誘発される「ジストロフィー退行期」を介して発生することが報告されている [22]。本研究で用いた CPA の用量 (75 mg/kg) は比較的 low 用量であり、ジストロフィー成長期経路を辿ったと考えられる。Hendrix ら [22] は、毛包はジストロフィー成長期の時点で、不完全な「一次回復」を起こし、その後、退行期から休止期への「二次回復」に移行すると報告している。これらのことから、本研究で CPA を投与した 3 群の day 21 の毛包は、一次回復中のジストロフィー成長期の毛包であり、毛包は拡大の過程にあると考えられる。このような理由で、休止期である control 群の毛包面積よりも大きい傾向が認められたと考えられる。

IGF-1 は、真皮毛包細胞 [49] だけでなく、表皮および顆粒層に存在する皮膚線維芽細胞 [36] から産生される。また IGF-1 は、毛包のオートクリンとパラクリンの両方の作用を有する可能性が示されており、成長期の毛髪の成長と細胞増殖の主要な調節因子である [36]。加えて、IGF-1 は、毛包の成長期を維持すること、減少により成長期の毛包が退行期へと移行することが報告されている [37]。Cotsarelis ら [50] および Nicole ら [51] は、IGF-1 が毛包の増殖、毛周期および毛包の分化に影響を与えることも報告している。本研究の day 16 の IGF-1 mRNA 発現量の結果から、EDR 0%群では CPA の投与により毛包が傷害され他の群と比較して IGF-1 mRNA 発現量が減少したと考えられる (図 7a)。一方、EDR 3%群および EDR 30%群の IGF-1 mRNA 発現量に低下はみられず control 群と同等であった。特に、EDR 3%群の IGF-1 mRNA 発現量は、EDR 0%群と比較して有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、EDR 軟膏の塗布が CPA の投与により引き起こされる IGF-1 産生細胞の損傷を抑制する可能性が示唆された。真皮毛包細胞由来の IGF-1 の発現は、通常、毛周期の成長期に増加傾向を示し、退行期

および休止期初期に急激に増加することが報告されている[52]。即ち、day 16 は成長期後期から退行期への移行期間中であり、IGF-1 の発現は増加傾向にある。さらに、day 21 は毛包が休止期にあり、IGF-1 の発現量がさらに高くなることが予想される。本研究では、control 群においてのみ IGF-1 mRNA 発現量の急激な増加を認めた(図 7b)。CPA を投与した 3 群の IGF-1 mRNA 発現量に関しても、day 16 と比較して day 21 で高値を示したが、その増加量はわずかであった。この結果は、control 群の毛包が休止期にある一方で、CPA を投与した 3 群の毛包がジストロフィー成長期にあることを示すものと考えられた。

細胞のアポトーシスは、Bcl-2 ファミリータンパク質により調節されており、Bcl-2 はアポトーシスの抑制に働き、Bax はアポトーシスのプロモーターであることが報告されている[53]。これらのバランスによりアポトーシスが制御されている[54]。また、Bcl-2 は毛包幹細胞で発現し[55]、発毛に関与することが知られている。一方、Bax はアポトーシス下の毛髪基質ケラチノサイトで産生され[56]、アポトーシスを促進する[57]。本研究の結果から、day 16 の Bcl-2 mRNA 発現量は、EDR 0%群で低下がみられたものの、EDR 3%群および EDR 30%群では発現低下はみられず、control 群と同程度の発現レベルに維持されていた(図 8a)。特に、EDR 0%群と EDR 3%群の間には有意な差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。これらの結果から、CPA の投与によって生じる毛包幹細胞の損傷が EDR の塗布によって抑制されたと考えられる。一方、CPA を投与した 3 群の Bax mRNA 発現量は、control 群と比較して低値であった(図 8b)。Day 21 の Bcl-2 mRNA 発現量および Bax mRNA 発現量に関しては、全ての群において低値を示したが(図 8c および d)、control 群の毛包は休止期を迎え、Bcl-2、Bax とともにさらに低下する段階であると考えられる。

Bcl-2 と Bax の発現量比率がアポトーシスの制御に関わっている可能性が報告されている[38]。抗アポトーシスタンパク質とアポトーシス促進タンパク質の比率は、細胞のアポトーシスを誘導する細胞の感受性に重要であるため、組織の恒常性に重要であると言われている[58]。本研究の結果から、day 16 の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は、control 群と比較して EDR 0%群で低下がみられた。一方、その低下は、EDR 3%群および EDR 30%群で抑制され、control 群と同等レベルであった。特に、EDR 0%群と EDR 3%群の間には有意な差 ( $P < 0.05$ ) がみられた(図 8e)。これらのことから、CPA 投与による脱毛の要因となる毛包のアポトーシスには、Bcl-2 および Bax が関与し、EDR の塗布により Bcl-2/Bax mRNA 発現比率が増加することにより脱毛が軽減されたと考えられる。Day 21 の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は、各群間で有意な差はみられなかった(図 8f)。この理由として、本研究の予備的試験で day 23 頃から発毛がみられたことから、CPA による細胞傷害作用が消失しつつあることが原因と考えられる。今後、EDR 軟膏を

継続塗布した際の発毛促進効果等についても詳細に調べる必要がある。

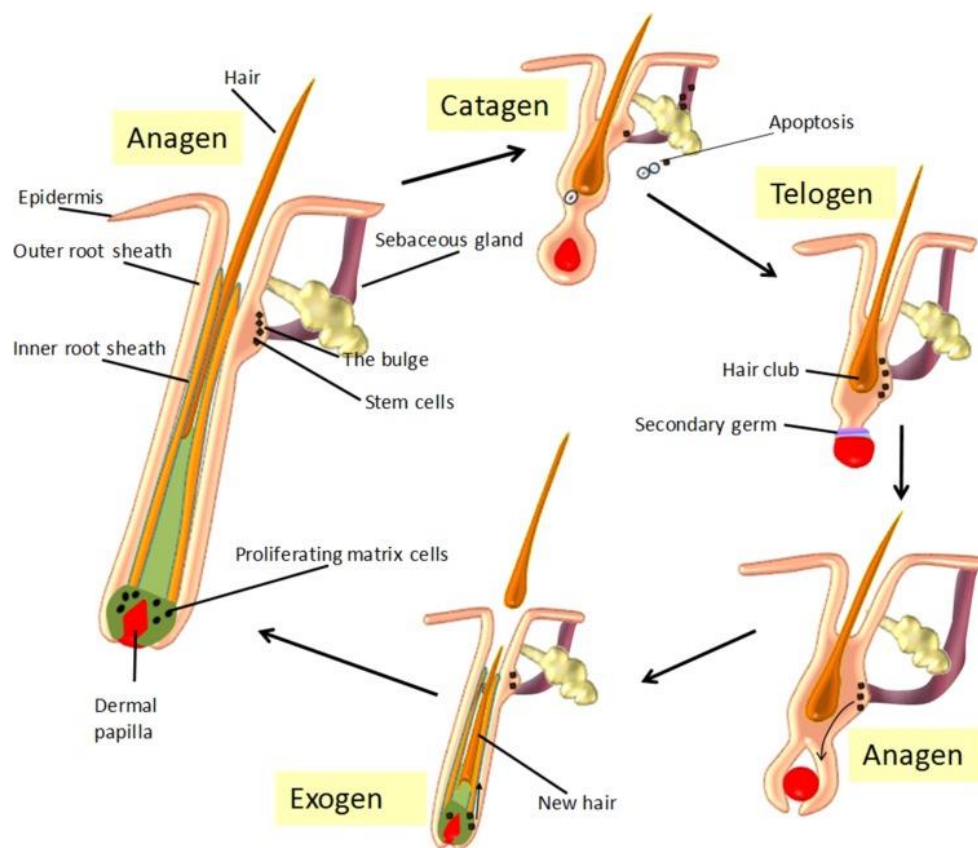


図9 毛周期の3つの主要な段階の概略

Anagen: 成長期, catagen: 退行期, telogen: 休止期, exogen: 脱毛期を示す。[出典: Christopher JD., Wafaa AT., Andrew C., Iain SH., Nikolaos TG., 2018. A Clinical and Biological Guide for Understanding Chemotherapy-Induced Alopecia and Its Prevention. *Oncologist*. **23**, 84-96. Fig. 2]

## 第2章 CPA誘発脱毛に対するエダラボンローションの抑制効果

### 2.1. 背景・目的

第1章では、3%EDR軟膏および30%EDR軟膏によりCPA誘発性のCIAを軽減できることが示された。ただし、実臨床で軟膏基剤を用いた場合、毛で覆われた頭皮へ確実に塗布することは難しい。また、ワセリンを中心とした油脂性基剤の特性上、薬物の放出性やべたつき等の使用感に課題がある。そこで、これらの難点を解決するため、EDRをローション剤に変更して効果を調べた。第十八改正日本薬局方における製剤総則では、投与経路および適応部位別に分類されており、外用剤は「皮膚などに適用する製剤」として総称され、外用固形剤、外用液剤、スプレー剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤および貼付剤の7種の製剤が収載されている。これらの中には、有効成分が皮膚もしくは皮膚直下の局所に送達され薬効を示す局所製剤および皮膚を透過し全身循環血流に送達させることを目的とした経皮吸収型製剤も含まれている。このなかで、頭皮への塗布を用途とする製剤には、外用固形剤または外用液剤の2剤形があてはまるが、主に潰瘍面に投与される外用固形剤（外用散剤）は、今回の用途としては適さない。一方、外用液剤はリニメント剤およびローション剤に細分類され、実臨床での使用を想定したうえでローション剤を選択した。ローション剤は、有効成分を水性の液に溶解又は乳化若しくは微細に分散させた外用液剤であると定義されたものである。加えて、油脂性軟膏剤とローション剤では物理化学的な特徴が異なる。ワセリンを代表とする油脂性軟膏剤は、皮膚保護作用が強く、基剤自体に皮膚柔軟作用や消炎作用があり、皮膚刺激性も低いため様々な皮膚疾患に用いられる。薬剤の皮膚浸透性は低いが高時間薬効が持続する特徴がある。一方、今回選択したローション剤は水中油型であり、皮膚への浸透性は高く即効性に優れる反面、持続時間が短い。水やアルコールを含有することから、軟膏と比較して皮膚刺激性があり、創部には適しないとされる。したがって、本研究の用途におけるローション剤は、正常な皮膚に対する塗布であり、毛で覆われた頭皮への塗布であることから、実臨床において最も適した剤型であると考えられた。

本章では、EDRローションによる、CIA抑制効果を調べることを目的とした。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 実験動物

Wistar系ラット（3週齢，雄性）は，日本エスエルシー株式会社（静岡）から購入した．飼育は，第1章1.2.1.と同様の方法で行った．

なお，本研究は摂南大学の動物実験に関する規定に従い実施した．  
許可番号：K20-19，K21-20

### 2.2.2. CIAラットモデルの作製

CIAラットモデルの作製は，第1章1.2.2.と同様の方法で行った．

### 2.2.3. 実験プロトコル

Wistar系ラット（3週齢，雄性）の背部の毛を成長期に誘導した後，以下の6群に分け，各濃度のEDRローションの脱毛抑制効果を調べた（図10）．

1) Control群：ローション基剤塗布（n=5）

2) EDR 0%群：CPA 75 mg/kg i. p. およびローション基剤塗布（n=5）

3) EDR 0.3%×1回群：CPA 75 mg/kg i. p. および0.3%EDRローション1日1回塗布（n=5）

4) EDR 3%×1回群：CPA 75 mg/kg i. p. および3%EDRローション1日1回塗布（n=5）

5) EDR 0.3%×2回群：CPA 75 mg/kg i. p. および0.3%EDRローション1日2回塗布（n=5）

6) EDR 3%×2回群：CPA 75 mg/kg i. p. および3%EDRローション1日2回塗布（n=5）

EDRローションの調製には，ローション基剤（親水クリーム（丸石製薬株式会社，大阪）を精製水と混和したもの）を用い，EDR（3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン（富士フィルム和光純薬株式会社，大阪）を0.3%および3%の濃度となるよう99.5%エタノール（ナカライテスク株式会社，京都）で溶解・混和し，親水クリームを25%含有する水中油型の乳剤性ローションとなるよう調製した．各群のローションは，day 9から屠殺前日のday 20まで1日1回あるいは2回塗布した．塗布量は，背部皮膚の2×3 cmあたり100 mg/回とした．

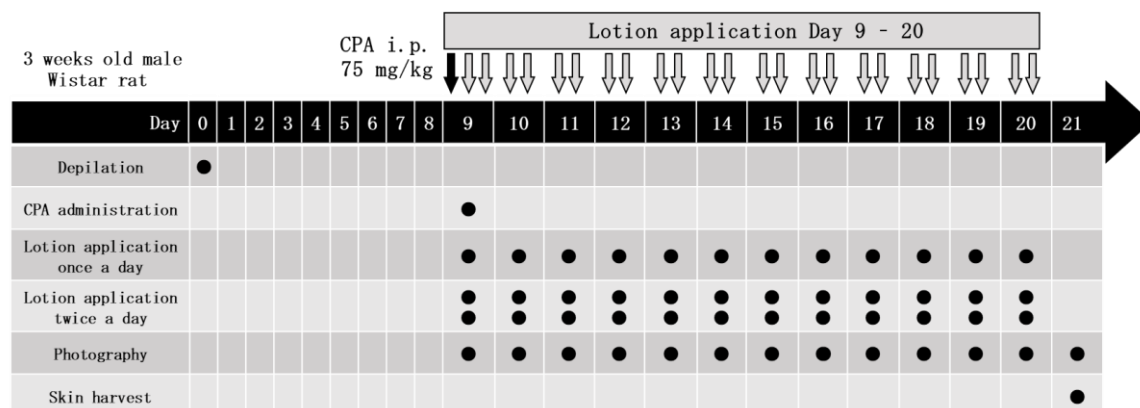


図 10 実験プロトコル

Wistar 系ラット（3 週齢，雄性）の背部皮膚を day 0 に脱毛し，成長期の毛を誘導した．Control 群（n=5，ローション基剤塗布），EDR 0% 群（n=5，CPA 75 mg/kg i. p. およびローション基剤 1 日 1 回塗布），EDR 0.3%×1 回群（n=5，CPA 75 mg/kg i. p. および 0.3%EDR ローション 1 日 1 回塗布），EDR 3%×1 回群（n=5，CPA 75 mg/kg i. p. および 3%EDR ローション 1 日 1 回塗布），EDR 0.3%×2 回群（n=5，CPA 75 mg/kg i. p. および 0.3%EDR ローション 1 日 2 回塗布），EDR 3%×2 回群（n=5，CPA 75 mg/kg i. p. および 3%EDR ローション 1 日 2 回塗布）に分けた．Day 9 に CPA（75 mg/kg）を単回腹腔内投与し，同日から屠殺前日（day 20）まで 1 日 1 回もしくは 1 日 2 回，ローション基剤または各濃度の EDR ローションを塗布した．写真撮影を 1 日 1 回行い，day 21 に屠殺後，背部皮膚を採取した．

#### 2.2.4. 被覆率の評価

被覆率の評価は，第 1 章 1.2.4. と同様の方法で行った．

#### 2.2.5. 皮膚の採取

皮膚の採取は，第 1 章 1.2.5. と同様の方法で行った．

#### 2.2.6. 皮膚組織切片の作製

皮膚組織切片の作製は，第 1 章 1.2.6. と同様の方法で行った．

#### 2.2.7. 毛包面積の評価

毛包面積の評価は，第 1 章 1.2.7. と同様の方法で行った．



#### 2.2.8. mRNA 発現量の評価

mRNA 発現量の評価は，第 1 章 1.2.8. と同様の方法で行った．

#### 2.2.9. Bcl-2/BAX mRNA 発現量比の算出

Bcl-2/BAX mRNA 発現量比の算出は，第 1 章 1.2.9. と同様の方法で行った．

#### 2.2.10. 統計解析

全てのデータは平均値±標準偏差 (SD) で示し，統計解析は第 1 章 1.2.10. と同様の方法で行った．

## 2.3. 結果

### 2.3.1. EDR ローション塗布による被覆率スコアに及ぼす効果

CPA 誘発脱毛に対する EDR ローションの抑制効果を調べるため、CIA を誘導したラット（脱毛（day 0）後に成長期毛包を誘導した後、CPA（75 mg/kg）を投与し化学療法誘発脱毛を誘導したモデル）に、CPA 投与と同日（day 9）より EDR ローション（0%、0.3%または3%）を1日1回もしくは1日2回による治療を開始し、day 21 まで治療した。観察期間の各個体の外観写真を盲検化し、3名個別に評価した。その3名のスコアから算出した被覆率スコアを用いて、EDR ローションの脱毛抑制効果を評価した（図 11a, b）。その結果、day 14 では全個体の被覆率スコアの平均は  $4.0 \pm 0.0$  であった。Control 群においては、観察期間を通して脱毛は認められず、最終観察日まで被覆率スコアは  $4.0 \pm 0.0$  であった。CPA を投与した5群においては、day 16 以降、被覆率スコアの低下を認め、day 16 の被覆率スコアは、それぞれ  $1.1 \pm 0.1$ （EDR 0%群）、 $1.7 \pm 0.3$ （EDR 0.3%×1回群）、 $1.0 \pm 0.0$ （EDR 3%×1回群）、 $2.3 \pm 0.6$ （EDR 0.3%×2回群）および  $1.8 \pm 0.5$ （EDR 3%×2回群）であった。その後、day 18 まで低下がみられ、被覆率スコアは、それぞれ  $0.0 \pm 0.0$ （EDR 0%群）、 $0.4 \pm 0.2$ （EDR 0.3%×1回群）、 $0.5 \pm 0.2$ （EDR 3%×1回群）、 $1.1 \pm 0.3$ （EDR 0.3%×2回群）および  $1.2 \pm 0.4$ （EDR 3%×2回群）であった。最終観察日の day 21 の各群の被覆率スコアは、それぞれ、 $4.0 \pm 0.0$ （control 群）、 $0.2 \pm 0.2$ （EDR 0%群）、 $0.7 \pm 0.5$ （EDR 0.3%×1回群）、 $0.5 \pm 0.1$ （EDR 3%×1回群）、 $1.6 \pm 0.4$ （EDR 0.3%×2回群）および  $1.4 \pm 0.4$ （EDR 3%×2回群）であり、control 群と比較して CPA を投与した5群では、脱毛がみられたものの、塗布回数に依存して脱毛の抑制効果が高くなる傾向がみられた。さらに、day 17 以降の EDR 0.3%×2回群および EDR 3%×2回群の被覆率スコアは、EDR 0%群の被覆率スコアと比較して有意に高値であった（ $P < 0.05$ ）。

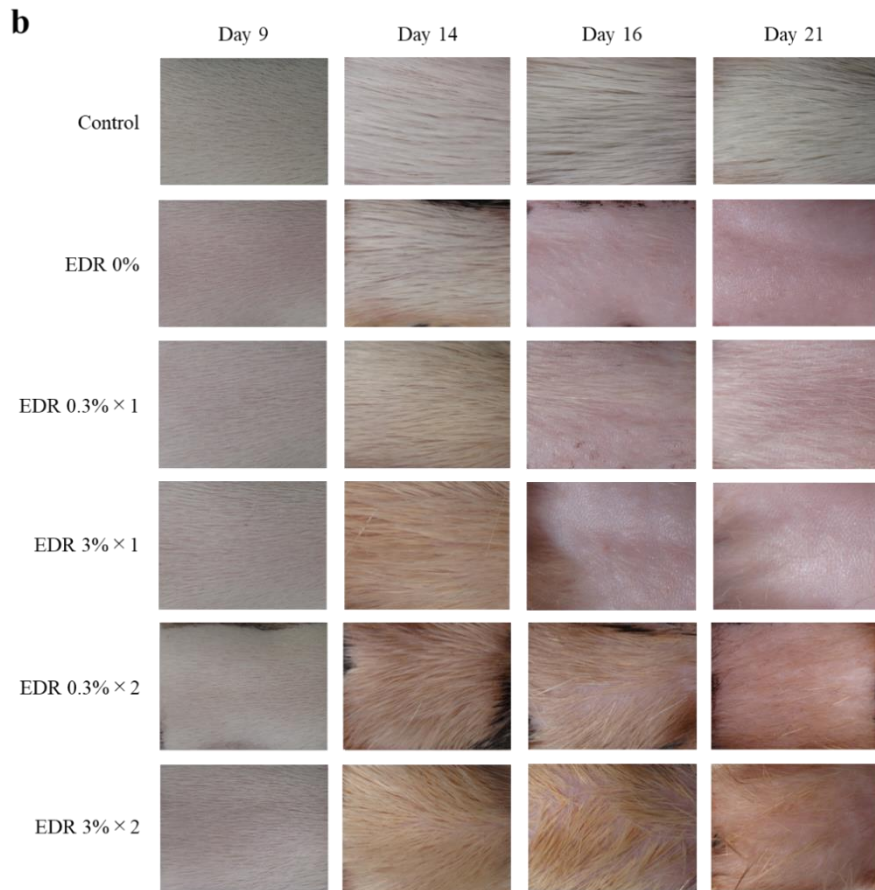
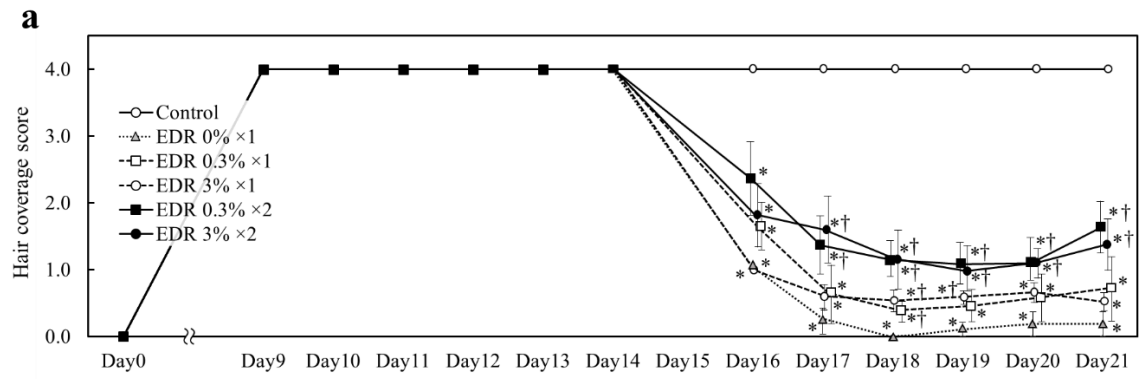


図 11 EDR ローション塗布による被覆率スコアの推移および背部皮膚の代表的な個体の外観写真

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期の毛包を誘導した。Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した。同日よりエダラボン (EDR) ローション (0%, 0.3% または 3%) を 1 日 1 回もしくは 1 日 2 回による治療を開始し, day 21 まで治療した。即ち, EDR 0% 群 (n=5), EDR 0.3% × 1 回群 (n=5) および EDR 3% × 1 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 1 回塗布し, EDR 0.3% × 2 回群 (n=5) および EDR 3% × 2 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 2 回塗布した。被覆率スコア (a) は, 各個体の外観写真を盲検化し, 3 名個別に評価した。その 3 名のスコアから平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した。なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*; vs. control 群, †; vs. EDR 0% 群) とした。また, 背部皮膚のマーキング領域 (2 × 3 cm) の day 9, 14, 16 および 21 の各群の代表的な個体の外観写真 (b) を示した。

### 2.3.2. EDR ローション塗布による毛包面積に与える影響

各濃度の EDR ローション塗布による毛包面積の変化を確かめる目的で, day 21 に採取した皮膚切片の Hematoxylin-Eosin 染色画像から毛包面積を算出した(図 12) . 各群の代表的な個体の Hematoxylin-Eosin 染色画像 (図 12a) と, 毛包面積の結果 (図 12b) を示した. 毛包面積は, それぞれ,  $0.077 \pm 0.002 \text{ mm}^2$  (control 群) ,  $0.097 \pm 0.003 \text{ mm}^2$  (EDR 0%群) ,  $0.077 \pm 0.001 \text{ mm}^2$  (EDR 0.3%×1 回群) ,  $0.098 \pm 0.001 \text{ mm}^2$  (EDR 3%×1 回群) ,  $0.081 \pm 0.001 \text{ mm}^2$  (EDR 0.3%×2 回群) および  $0.085 \pm 0.001 \text{ mm}^2$  (EDR 3%×2 回群) であり, 各群間で有意な差は認められなかった.

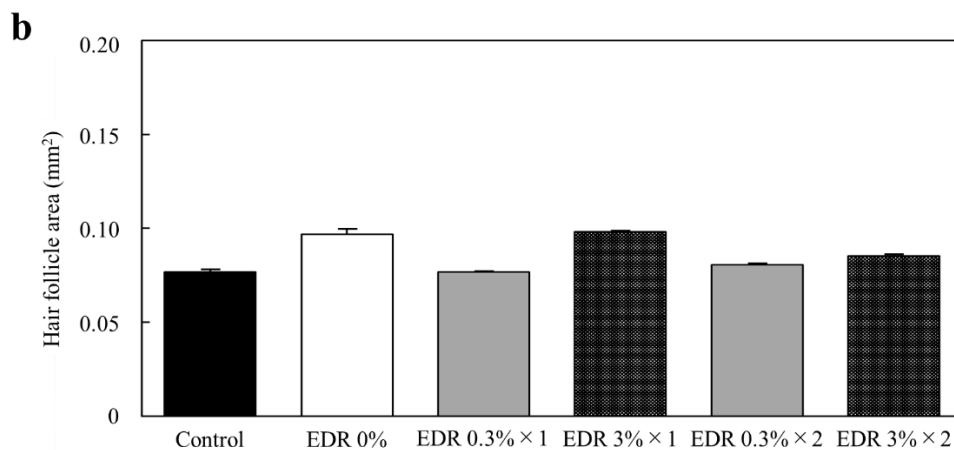
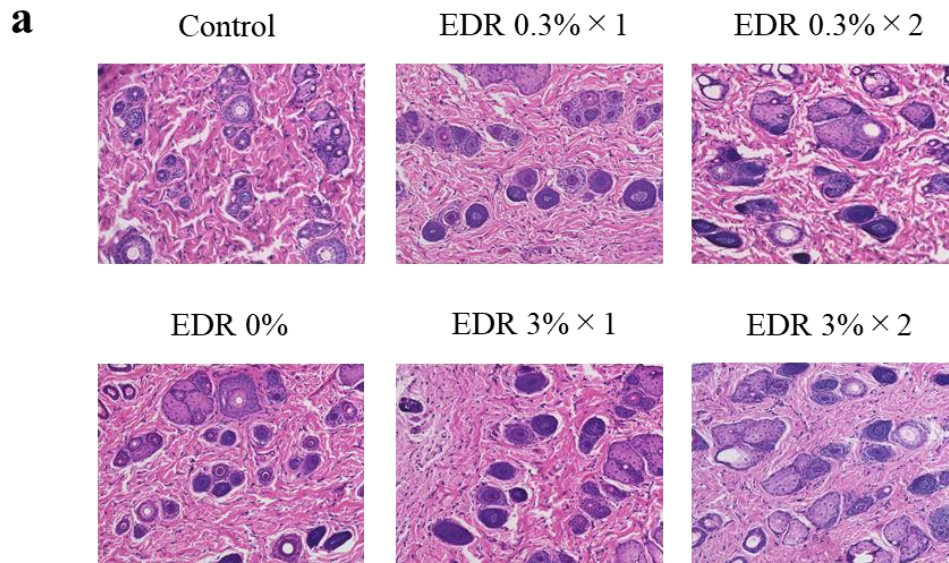


図 12 背部皮膚組織の Hematoxylin-Eosin 染色画像と毛包面積の値

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期の毛包を誘導した. Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した. 同日よりエダラボン (EDR) ローション (0%, 0.3% または 3%) を 1 日 1 回もしくは 1 日 2 回塗布し, day 21 まで治療した. 即ち, EDR 0% 群 (n=5), EDR 0.3% × 1 回群 (n=5) および EDR 3% × 1 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 1 回塗布し, EDR 0.3% × 2 回群 (n=5) および EDR 3% × 2 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 2 回塗布した. 最終観察日に採取した背部皮膚に対し Hematoxylin-Eosin 染色を行い, BZ-X800 Analyzer を用いて毛包面積を算出した. 代表的な Hematoxylin-Eosin 染色画像 (a) および算出した毛包面積の平均値 ± 標準偏差 (SD) (b) を示した. なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

### 2.3.3. 背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量に対する EDR ローションの効果

EDR ローションが毛包の増殖, 毛周期および毛包の分化に關与する IGF-1 の発現に影響を与えるか否かを調べるため, 背部皮膚組織の IGF-1 の mRNA 発現量を調べた. 即ち, 各観察期間後に採取した背部皮膚組織を用いて IGF-1 mRNA 発現量を定量した (図 13). Control 群の IGF-1 mRNA 発現量を  $1.00 \pm 0.61$  として表した. その他の 5 群の IGF-1 mRNA 発現量は, それぞれ,  $0.12 \pm 0.05$  (EDR 0% 群),  $0.42 \pm 0.21$  (EDR 0.3% $\times$ 1 回群),  $0.18 \pm 0.09$  (EDR 3% $\times$ 1 回群),  $0.05 \pm 0.03$  (EDR 0.3% $\times$ 2 回群) および  $0.12 \pm 0.05$  (EDR 3% $\times$ 2 回群) であった.

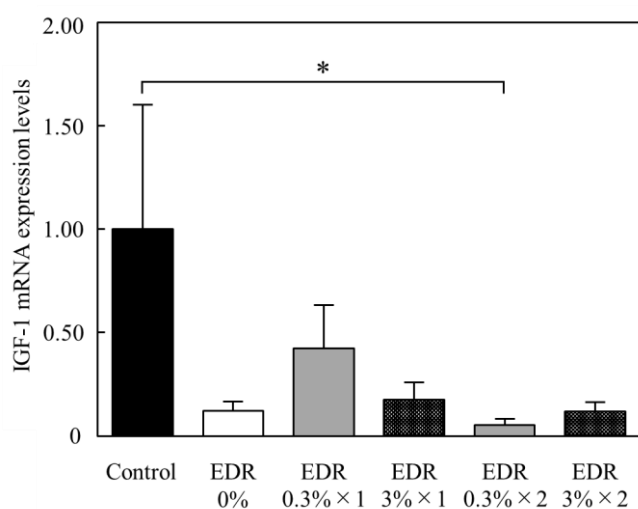


図 13 観察期間終了時点における背部皮膚組織の IGF-1 mRNA 発現量の比較

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した. Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した. 同日よりエダラボン (EDR) ローション (0%, 0.3% または 3%) 1 日 1 回もしくは 1 日 2 回による治療を開始し, day 21 まで治療した. 即ち, EDR 0% 群 ( $n=5$ ), EDR 0.3% $\times$ 1 回群 ( $n=5$ ) および EDR 3% $\times$ 1 回群 ( $n=5$ ) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 1 回塗布し, EDR 0.3% $\times$ 2 回群 ( $n=5$ ) および EDR 3% $\times$ 2 回群 ( $n=5$ ) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 2 回塗布した. 最終観察日に採取した背部皮膚組織 (表皮から真皮) における IGF-1 mRNA 発現量を, real-time RT-PCR 法によって定量し, IGF-1 mRNA 発現量の平均値  $\pm$  標準偏差 (SD) を算出した. なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney  $U$  検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

#### 2.3.4. 背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA および Bax mRNA 発現量に対する EDR ローションの効果

EDR ローションがアポトーシスに關与する Bcl-2 (アポトーシス阻害タンパク質) および Bax (アポトーシス促進タンパク質) の発現に与える影響を調べるため、各群の観察期間後に採取した背部皮膚組織を用いて Bcl-2 (図 14a) および Bax (図 14b) の mRNA 発現量を定量した。Control 群の Bcl-2 mRNA 発現量 ( $1.00 \pm 0.69$ ) と比較して、CPA を投与した全ての群で Bcl-2 mRNA 発現量の低下がみられた (EDR 0%群:  $0.09 \pm 0.03$ , EDR 0.3% $\times$ 1 回群:  $0.27 \pm 0.12$ , EDR 3% $\times$ 1 回群:  $0.24 \pm 0.10$ , EDR 0.3% $\times$ 2 回群:  $0.03 \pm 0.01$  および EDR 3% $\times$ 2 回群:  $0.18 \pm 0.07$ )。EDR 3% $\times$ 2 回群では、control 群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) な減少がみられた。一方、Bax mRNA 発現量は、それぞれ control 群:  $1.00 \pm 0.54$ , EDR 0%群:  $0.32 \pm 0.13$ , EDR 0.3% $\times$ 1 回群:  $0.68 \pm 0.32$ , EDR 3% $\times$ 1 回群:  $0.53 \pm 0.21$ , EDR 0.3% $\times$ 2 回群:  $0.12 \pm 0.08$  および EDR 3% $\times$ 2 回群:  $0.37 \pm 0.19$  であり、control 群以外の CPA を投与した群で発現低下の程度は低いものの、Bcl-2 とほぼ同様の傾向であった。

#### 2.3.5. Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に対する EDR ローションの効果

EDR ローションが Bcl-2/Bax mRNA 発現量比に与える影響を調べるため、各群の観察期間後に採取した背部皮膚組織を用いて定量した Bcl-2 および Bax の mRNA 発現量から、Bcl-2/Bax mRNA 発現量比を算出した (図 14c)。

Control 群の Bcl-2/Bax mRNA 発現量比 ( $0.80 \pm 0.21$ ) と比較して、特に、EDR 0%群 ( $0.41 \pm 0.10$ ) および EDR 0.3% $\times$ 1 回群 ( $0.37 \pm 0.06$ ) で減少傾向を示した。一方、EDR 3% $\times$ 1 回群 ( $0.48 \pm 0.17$ )、EDR 0.3% $\times$ 2 回群 ( $0.58 \pm 0.16$ ) および EDR 3% $\times$ 2 回群 ( $0.87 \pm 0.26$ ) となるに従い、Bcl-2/Bax mRNA 発現量比は増加した。特に、EDR 3% $\times$ 2 回群では、control 群と同等レベルに維持されていた。



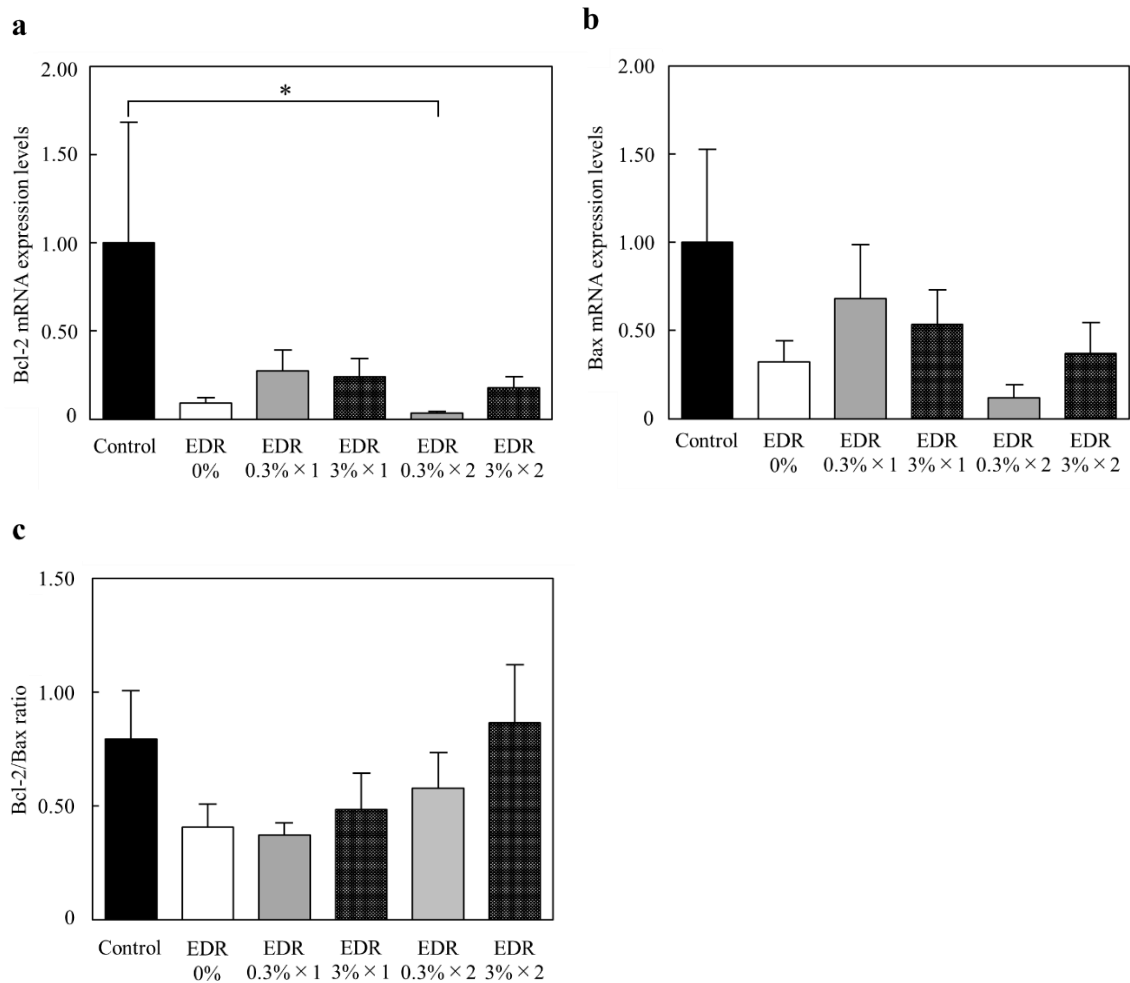


図 14 観察期間終了時点における背部皮膚組織の Bcl-2 mRNA 発現量, Bax mRNA 発現量および Bcl-2/Bax mRNA 発現量比の比較

Day 0 にラットの背部皮膚を脱毛し成長期毛包を誘導した. Day 9 に 75 mg/kg の CPA を単回腹腔内投与して CIA を誘導した. 同日よりエダラボン (EDR) ローション (0%, 0.3% または 3%) による治療を開始し, day 21 まで治療した. 即ち, EDR 0% 群 (n=5), EDR 0.3% × 1 回群 (n=5) および EDR 3% × 1 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 1 回塗布し, EDR 0.3% × 2 回群 (n=5) および EDR 3% × 2 回群 (n=5) には, それぞれの濃度の EDR ローションを 1 日 2 回塗布した. 最終観察日に採取した背部皮膚組織 (表皮から真皮) における Bcl-2 mRNA 発現量および Bax mRNA 発現量を, real-time RT-PCR 法によって定量し, Bcl-2 mRNA 発現量 (a) および Bax mRNA 発現量 (b) の平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した. 加えて, 得られた結果から, Bcl-2/Bax mRNA 発現量比 (c) の平均値 ± 標準偏差 (SD) を算出した. なお, 統計学的有意差は, Mann-Whitney *U* 検定を用いて解析し,  $P < 0.05$  を有意差あり (\*) とした.

## 2.4. 考 察

第1章でCIAに対するEDR軟膏の脱毛抑制効果が示された。本章では、被髪された頭皮へ確実に塗布することができる剤型として、EDRローションによるCIAの脱毛抑制効果を調べた。加えて、第1章の結果から、EDRの効果は3%を超える濃度には依存しないことが示唆されたことから、EDRの濃度を3%およびより低濃度の0.3%のローション剤を調製した。一般に臨床で使用されるローション剤の用法・用量の多くは、通常、1日1~数回適量を患部に塗布することが指定されている。従って、本研究のEDRローションについても同様に1日1回および1日2回の塗布回数とした。

CPAを投与した5群の全てにおいて被覆率スコアの低下を認めたが、EDR 0%と比較してEDR 0.3%×1回群、EDR 3%×1回群、EDR 0.3%×2回群およびEDR 3%×2回群においてスコアの低下の抑制を認めた。特に1日2回塗布を行った2群、即ち、EDR 0.3%×2回群およびEDR 3%×2回群においては、EDR 0%群と比較して有意にスコアの低下を抑制することが示された(図11a) ( $P < 0.05$ )。この結果は、第1章で得られたEDR軟膏による脱毛抑制効果と同程度の効果であった。全ての群の被覆率スコアの推移も、軟膏を塗布した場合と同様にday 18以降は変化を認めなかったが、EDR 0.3%×2回群およびEDR 3%×2回群の被覆率スコアは、day 20からday 21にかけて上昇傾向を示したことから、EDRローションの塗布によってCIAの抑制だけでなく、CIAからの回復に繋がる再発毛促進効果を有する可能性も考えられた。

毛包面積の結果については、第1章の観察期間day 21の結果と同様に各群間で有意な差は認められなかった。休止期の毛包と考えられるcontrol群の毛包面積は縮小傾向を示し、ジストロフィー成長期にあるCPAを投与された5群の毛包面積は拡大の過程にあることが考えられる。例えば、観察期間をday 25あるいはday 30程度まで延長することで、EDRローションによる発毛促進効果の有無を明らかとする必要がある。

前述のようにday 21のcontrol群の毛包は休止期であり、IGF-1 mRNA発現量は急激に増加していると考えられる[51]。一方、CPAを投与した5群はジストロフィー成長期と考えられ、観察期間終了時のday 21以降、徐々にIGF-1 mRNAの発現量が増加すると推測していた。その結果、推測通りcontrol群のIGF-1 mRNA発現量は、CPAを投与した5群と比較して高値を示した。

CPAを投与した5群のBcl-2 mRNA発現量およびBax mRNA発現量は、control群と比較して低値であった。Bcl-2およびBax mRNA発現量から算出したBcl-2/Bax mRNA発現量比では、EDR 0%群およびEDR 0.3%×1回群はcontrol群と比較して低値を示した。一方、EDR塗布回数あるいは塗布量の増加に伴いBcl-2/Bax mRNA発現量比は高値を示し、特に、EDR 3%×2回群でcontrol群と同等

レベルに維持されていた。前述のように Bcl-2 と Bax の発現量比率は、アポトーシスの制御に関わっていることが報告されている[37]。EDR ローションの塗布回数あるいは塗布量を増加させることで、毛包のアポトーシス抑制効果が高まり、CIA 抑制効果および再発毛の促進に繋がる可能性が示唆された。

本研究では、EDR 軟膏あるいはローションの塗布により、CPA の投与によって生じる CIA に対する抑制効果が示された。EDR ローションの塗布回数を 1 日 1 回から 2 回に増やすことで、軟膏と同等の脱毛抑制効果が得られることが示された。一般に、殺細胞性抗癌剤は、細胞分裂の盛んな細胞に作用しやすく、皮膚では、基底細胞の分裂や増殖が最も阻害される。これにより、角質層は薄くなり、皮脂腺および汗腺の分泌が抑制される。その結果、皮膚本来の機能である水分喪失防止・保湿機能、静菌作用は著しく低下し、炎症や乾燥などが起こる。Selleri ら[59]は、ドキソルビシンの投与により、皮脂腺細胞の増殖抑制やアポトーシスが生じ、CIA で頻繁に観察される皮膚の乾燥が生じることを報告している。このことは、本研究で、保湿性の高い油脂性基剤を用いた EDR 軟膏や EDR ローションの 2 回塗布で、他の群と比較して比較的高い抑制効果が得られたことと合致する。即ち、水分喪失を抑制し、保湿効果を高めることにより CIA の抑制効果を増強した可能性が考えられる。今後、皮脂腺や汗腺の状態についても詳細に調べる必要がある。

ただし、これらの効果には限界があると考えられる。即ち、本研究で得られた結果のように、EDR 軟膏あるいはローションによる抗酸化作用のみでは、約 50% 程度の抑制が限界である可能性がある。従って、より高い脱毛抑制効果を得るためには、CIA を生じる他の原因に対するアプローチも必要である。例えば、脱毛を抑制するだけでなく、発毛を促進することも重要であると考えられる。このような理由で、毛包幹細胞における Ki67 タンパク質の発現の程度に着目している。Ki67 は、増殖中の細胞の全ての細胞周期 (G1 期, S 期, G2 期, M 期) で発現する細胞増殖マーカーとして用いられている。予備的研究として、本研究の第 2 章の研究で採取した皮膚組織切片を用いて、抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、毛包の Ki67 陽性細胞数が、control 群および EDR 0% 群と比較して、EDR 0.3%×2 回群および EDR 3%×2 回群で多い傾向がみられた。control 群の毛包は休止期であり、Ki67 陽性細胞は認めないことが考えられる。一方で、ジストロフィー成長期にある CPA を投与された 5 群の毛包においては、EDR 0.3%×2 回群および EDR 3%×2 回群は EDR の塗布により、毛包の細胞周期の進行が早まり、CIA からの回復に繋がる再発毛促進効果を有する可能性が考えられる。従って、次のアプローチの 1 つとして、本来の癌化学療法に影響を及ぼすことなく発毛を促進できる薬剤についても詳細に調べる必要がある。

もう 1 つのアプローチとして、頭皮の血管を収縮させることによる抗癌剤送

達量を減少させることである。Cheryl ら[60]は、アドレナリン作動性血管収縮剤を局所に塗布することで、CIA を予防または抑制できる可能性を報告している。同時に、十分な効果を得るためには、頻回塗布が必要であること、および治療により皮膚の白化が認められることを報告している。従って、EDR の外用療法との併用により、高い脱毛抑制効果および発毛促進効果が得られる可能性がある。この併用療法の有用性が明らかとなれば、現在、臨床で用いられている頭皮冷却装置システムを用いた方法よりも、汎用性が高く、患者負担を軽減できる予防・治療方法になると考えられる。

## 総括

本研究で得られた成果は以下の通りである。

CIA は生活の質を大幅に低下させる要因のひとつである。特に女性においては、脱毛による外見の変化が最も苦痛な副作用であり、化学療法を継続する意欲の低下および治療の拒否に繋がるとされる。

第1章では、抗酸化物質のひとつである EDR を軟膏剤として塗布することで、CPA 誘発脱毛を軽減できること、さらに、3%を超える濃度には依存しないことを示した。

第2章では、被髪された頭皮へ確実に塗布することができる剤型として、EDR ローションを調製し、1日2回塗布を行うことで軟膏と同等の脱毛抑制効果が得られることを示した。さらに、この脱毛抑制効果は、毛包細胞のアポトーシスを抑制することで得られたことを Bcl-2 と Bax mRNA 発現量およびその比率から明らかとした。加えて、さらに詳細な検討を必要とするが、EDR の塗布により再発毛の促進に繋がる糸口を得た。

ただし、EDR の抗酸化作用のみでは、脱毛抑制効果に限界があるため、発毛を促進できる薬剤や毛包への抗癌剤送達量を減少させることができる薬剤についても調べる必要がある。併せて、CIA を生じる他の原因についても明らかとし、より高い脱毛抑制効果を得ることができる予防・治療方法を構築する必要がある。

以上、本研究により、抗酸化物質 EDR を用いた CIA 予防法を探究するための基礎的所見が集積でき、化学療法による最も苦痛な副作用軽減への一助とすることができた。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、日頃より多大なるご支援をいただきました社会医療法人 高清会 高井病院 薬剤部各位に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました摂南大学薬学部 病態医科学研究室 教授 河野 武幸先生に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始多大なご指導を賜りました摂南大学薬学部 病態医科学研究室 准教授 辻 琢己先生に厚く御礼を申し上げ、深謝の意を表します。

摂南大学大学院で学ぶ機会を与えてくださった本学元教授 故 藤多 哲朗先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にご協力いただいた摂南大学薬学部 病態医科学研究室 講師 吉田 侑矢先生、研究室の諸氏に深く感謝致します。

## 引用文献

1. Katanoda K., Hori M., Saito E., Shibata A., Ito Y., Minami T., Ikeda S., Suzuki T., Matsuda T., 2021. Updated Trends in Cancer in Japan: Incidence in 1985-2015 and Mortality in 1958-2018-A Sign of Decrease in Cancer Incidence. *J Epidemiol.* **31**, 426-450.
2. Sook JY., Seong JK., 2007. Hair loss pattern due to chemotherapy-induced anagen effluvium: a cross-sectional observation. *Dermatology.* **215**, 36-40.
3. Julie Lx., Elizabeth M., Louise P., 2008. Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *Psychooncology.* **17**, 317-28.
4. Paul JH., Diane B., Mitch G., Gary HL., Nelson R., Denise Y., 2004. Chemotherapy-induced alopecia: psychosocial impact and therapeutic approaches. *Support Care Cancer.* **12**, 543-9.
5. McGarvey EL., Baum LD., Pinkerton RC., Rogers LM., 2001. Psychological sequelae and alopecia among women with cancer. *Cancer Pract.* **9**, 283-9.
6. Tierney AJ., Taylor J., Closs SJ., 1992. Knowledge, expectations and experiences of patients receiving chemotherapy for breast cancer. *Scand J Caring Sci.* **6**, 75-80.
7. 2013 がん体験者の悩みや負担等に関する実態調査報告書, <https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000129860.pdf>.
8. Fisher B., Brown AM., Dimitrov V., Poisson R., Redmond C., Margolese RG., Bowman D., Wolmark N., Wickerham DL., Kardinal CG., 1990. Two months of doxorubicin-cyclophosphamide with and without interval reinduction therapy compared with 6 months of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in positive-node breast cancer patients with tamoxifen-nonresponsive tumors: results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-15. *J Clin Oncol.* **8**, 1483-96.
9. Miguel M., Álvaro RL., Amparo R., Emilio A., Lourdes C., Manuel RB., Blanca M., César A., Rodríguez., Carmen C., Enrique A., José A., López GA., María DG., Sergio A., Jesús FG., Francisco V., José P., Manuel R., Jose Manuel GM., Ana L., Isabel A., Miguel AS., José IM.,

- Antonio A., José MB., Arrate P., Alfonso M., Amadeu P., Jose RM., Enrique A., Encarna A., José VÁ., José Luis GP., Pedro SR., Sonia G., José Manuel LV., On behalf of the GEICAM 9906 Study Investigators, 2008. Randomized phase 3 trial of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide alone or followed by Paclitaxel for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* **100**, 805-14.
10. Andreas B., Hans JL., Werner M., Hans PA., Volker M., Serban C., Thomas B., Barbara R., Matthias W., Willibald S., Sigrid O., Ulrike N., Christian J., Günther E., Uwe W., Walther K., Jacobus P., Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group, 2003. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* **95**, 1320-9.
  11. Watanabe T., Yagata H., Saito M., Okada H., Yajima T., Tamai N., Yoshida Y., Takayama T., Imai H., Nozawa K., Sangai T., Yoshimura A., Hasegawa Y., Yamaguchi T., Shimosuma K., Ohashi Y., 2019. A multicenter survey of temporal changes in chemotherapy-induced hair loss in breast cancer patients. *PLoS One.* **14**, e0208118.
  12. Brien RO., Zelson JH., Schwartz AD., Pearson HA., 1970. Scalp tourniquet to lessen alopecia after vincristine. *N Engl J Med.* **283**, 1469.
  13. Julie N., Tao W., Cynthia O., Polly N., Kristen O., Steven P., Frankie H., Jame A., Mario L., Jay C., Richard P., Mari R., Susan H., Kent O., Mothaffar R., 2016. Effect of a Scalp Cooling Device on Alopecia in Women Undergoing Chemotherapy for Breast Cancer: The SCALP Randomized Clinical Trial. *JAMA.* **317**, 596-605.
  14. FDA NEWS RELEASE. 2017. FDA clears expanded use of cooling cap to reduce hair loss during chemotherapy. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-clears-expanded-use-cooling-cap-reduce-hair-loss-during-chemotherapy>.
  15. 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 審議結果報告書平成 31 年 3 月 7 日 [https://www.pmda.go.jp/medical\\_devices/2019/M20190419001/380130000\\_23100BZX00087000\\_A100\\_1.pdf?fbclid=IwAR0\\_ub3NFZLMRv9wI2trFbejwWzDC4DGUdC9XN\\_jzeI7cRm5Uonmm6IOSoQ](https://www.pmda.go.jp/medical_devices/2019/M20190419001/380130000_23100BZX00087000_A100_1.pdf?fbclid=IwAR0_ub3NFZLMRv9wI2trFbejwWzDC4DGUdC9XN_jzeI7cRm5Uonmm6IOSoQ)
  16. Giselle BS., Kathryn C., Aline D., Corina H., 2020. Scalp cooling to prevent chemotherapy-induced alopecia. *An Bras Dermatol.* **95**, 631-637.



17. Manon K., Carolien HS., Corina H., Johan N., 2013. Factors influencing the effectiveness of scalp cooling in the prevention of chemotherapy-induced alopecia. *Oncologist*. **18**, 885-91.
18. Kanchanlata S., Mustansir B., Yasar AK., Ganapathi B., Thankamani M., 2018. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity - Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J*. **26**, 177-190.
19. Charles BS., Nicole LS., Victoria S., Charles BS., 2007. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med*. **13**, 22-8.
20. Charles BS., Nicole LS., Victoria S., Charles BS., 2007. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, Part 2. *Altern Ther Health Med*. **13**, 40-7.
21. Hagiwara S., Uchida T., Koga H., Inomata M., Yoshizumi F., Moriyama M., Kitano S., Noguchi T., 2011. The  $\alpha$ -lipoic acid derivative sodium zinc dihydrolipoylhistidinate reduces chemotherapy-induced alopecia in a rat model: a pilot study. *Surg Today*. **41**, 693-7.
22. Hendrix S., Handjiski B., Peters MJ., Paus R., 2005. A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice. *J Invest Dermatol*. **125**, 42-51.
23. Andrei AS., Frank S., Tatyana YS., Natalia VB., Barbara AG., Vladimir AB., 2004. Fas signaling is involved in the control of hair follicle response to chemotherapy. *Cancer Res*. **64**, 6266-70.
24. Tanaka M., Sugimura N., Fujisawa A., Yamamoto Y., 2017. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 1. Sodium bisulfite. *J Clin Biochem Nutr*. **61**, 159-163.
25. Feng S., Xiao LH., Xin L., Mang TS., 2017. A Novel LC-MS-MS Method With an Effective Antioxidant for the Determination of Edaravone, a Free-Radical Scavenger in Dog Plasma and its Application to a Pharmacokinetic Study. *J Chromatogr Sci*. **55**, 595-602.
26. Tanaka M., Motomiya S., Fujisawa A., Yamamoto Y., 2017. Stabilizers of edaravone aqueous solution and their action mechanisms. 2. Glutathione. *J Clin Biochem Nutr*. **61**, 164-168.

27. Bos JD., Meinardi MM., 2000. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol.* **9**, 165-9.
28. 杉林堅次, 2011. 次世代経皮吸収型製剤の開発と応用. シーエムシー出版.
29. Ankit P., Krishna K., Chun CT., Sanjay G., Xin FZ., 2018. Self-nanomicellizing solid dispersion of edaravone: part I - oral bioavailability improvement. *Drug Des Devel Ther.* **12**, 2051-2069.
30. Paul JH., Diane B., Mitch G., Gary HL., Nelson R., Denise Y., 2004. Chemotherapy-induced alopecia: psychosocial impact and therapeutic approaches. *Support Care Cancer.* **12**, 543-9.
31. Julie L., Elizabeth M., Louise P., 2008. Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *Psychooncology.* **17**, 317-28.
32. Hussein AM., 1995. Protection against cytosine arabinoside-induced alopecia by minoxidil in a rat animal model. *Int J Dermatol.* **34**, 470-3.
33. Paus R., Schilli MB., Handjiski B., Menrad A., Henz BM., Plonka P., 1996. Topical calcitriol enhances normal hair regrowth but does not prevent chemotherapy-induced alopecia in mice. *Cancer Res.* **56**, 4438-43.
34. Perez JE., Macchiavelli., Leone BA., Romero A., Rabinovich MG., Goldar D., Vallejo C., 1986. High-dose alpha-tocopherol as a preventive of doxorubicin-induced alopecia. *Cancer Treat Rep.* **70**, 1213-4.
35. Onaolapo AY., Adebayo AA., Onaolapo OJ., 2018. Oral phenytoin protects against experimental cyclophosphamide-chemotherapy induced hair loss. *Pathophysiology.* **25**, 31-39.
36. Rudman SM., Philpott MP., Thomas GA., Kealey T., 1997. The role of IGF-I in human skin and its appendages: morphogen as well as mitogen? *J Invest Dermatol.* **109**, 770-7.
37. Philpott MP., Sanders DA., Kealey T., 1994. Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth in vitro. *J Invest Dermatol.* **102**, 857-61.
38. Zhao J., Li J., Li W., Li Y., Shan H., Gong Y., Yang B., 2010. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a

- canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol.* **159**, 1584-1594.
39. Virendra NS., Govind S., Ashok KA., Rashmi M., 2013. Hair biology and its comprehensive sequence in female pattern baldness: treatment modalities--part III. *Skinmed.* **11**, 287-90.
  40. Christopher JD., Wafaa AT., Andrew C., Iain SH., Nikolaos TG., 2018. A Clinical and Biological Guide for Understanding Chemotherapy-Induced Alopecia and Its Prevention. *Oncologist.* **23**, 84-96.
  41. Lindner G., Botchkarev VA., Botchkareva NV., Ling G., Veen C., Paus R., 1997. Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am J Pathol.* **151**, 1601-17.
  42. Paus R., Haslam IS., Sharov AA., Botchkarev VA., 2013. Pathobiology of chemotherapy-induced hair loss. *Lancet Oncol.* **14**, e50-9.
  43. Vladimir AB., 2003. Molecular mechanisms of chemotherapy-Induced hair loss. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **8**, 72-5.
  44. Natalia V., Gurpreet A., Douglas S., 2006. Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol.* **126**, 258-64.
  45. Paus R., Handjiski B., Eichmüller S., Czarnetzki BM., 1994. Chemotherapy-induced alopecia in mice. Induction by cyclophosphamide, inhibition by cyclosporine A, and modulation by dexamethasone. *Am J Pathol.* **144**, 719-34.
  46. Schilli MB., Paus R., Menrad A., 1998. Reduction of intrafollicular apoptosis in chemotherapy-induced alopecia by topical calcitriol-analogs. *J Invest Dermatol.* **111**, 598-604.
  47. Yano K., Brown LF., Detmar M., 2001. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest.* **107**, 409-17.
  48. Müller R., Handjiski B., Veen C., Eichmüller S., Foitzik K., McKay IA., Stenn KS., Paus R., 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol.* **117**, 3-15.
  49. Cook JJ., Haynes KM., Werther GA., 1988. Mitogenic effects of growth hormone in cultured human fibroblasts. Evidence for action via local insulin-like growth factor I production. *J Clin Invest.* **81**, 206-12.
  50. Cotsarelis G., Millar SE., 2001. Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment. *Trends Mol Med.* **7**, 293-301.

51. Nicole W., Thomas S., 2005. Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J Invest Dermatol.* **125**, 873-82.
52. Thomas S., Martin B., Nicole W., Thomas B., 2004. Major shifts in genomic activity accompany progression through different stages of the hair cycle. *Gene Expr Patterns.* **4**, 141-52.
53. Andrew JS., Joel DL., Erwin RB., Scott LA., Nathaniel DC., Jun C., Brian DD., Hong D., Sari HE., Wayne JF., David H., Sarah GH., Sha J., Seong LK., Peter JK., Lloyd TL., Jackie L., Heather LM., Kennan CM., Kylie DM., Michael JM., Paul MN., Anatol O., Chang HP., Cheol MP., Darren CP., Andrew WR., Deepak S., John FS., Morey LS., Gerard MS., Stephen KT., Chris T., Michael DW., Yu X., John CX., Haichao Z., Rod AH., Saul HR., Steven WE., 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med.* **19**, 202-8.
54. Müller S., Rossiter H., Lindner G., Peters EM., Kupper TS., Paus R., 1999. Hair follicle apoptosis and Bcl-2. *J Investig Dermatol Symp Proc.* **4**, 272-7.
55. Stenn KS., Lawrence L., Veis D., Korsmeyer S., Seiberg M., 1994. Expression of the bcl-2 protooncogene in the cycling adult mouse hair follicle. *J Invest Dermatol.* **103**, 107-11.
56. Maria G., Nele F., Geert L., Xavier S., Peter V., 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **304**, 487-97.
57. Stuart SM., Kristiina V., 2004. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta.* **1692**, 145-57.
58. Ramarao M., Sreelatha G., Kiranmai A., Christopher SG., Meena G., Dzung HD., Sanjeeva M., Jasti SR., 2010. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas. *PLoS One.* **5**, e13731.
59. Selleri S., Seltmann H., Gariboldi S., Shirai YF., Balsari A., Zouboulis CC., Rumio C., 2006. Doxorubicin-induced alopecia is associated with sebaceous gland degeneration. *J Invest Dermatol.* **126**, 711-20.
60. Cheryl MS., William EF., 2015. A new strategy to prevent chemotherapy and radiotherapy-induced alopecia using topically applied

vasoconstrictor. *Int J Cancer*. **136**, 195-203.