

目 次

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学 大学院医学薬学研究部長

まえがき

酒 井 秀 紀

I. 車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬（薬用植物）の探索 1

I-1 慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討 4

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学

准教授 安 東 嗣 修

助 教 歌 大 介

I-2 車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索 10

富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野

教 授 小 松 かつ子

准教授 當 銘 一 文

I-3 車前子由来物質のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析 17

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 分子医科薬理学講座

教 授 服 部 裕 一

助 教 大 橋 若 奈

II. 急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的治療法の創出 —東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチ— 23

II-1 病態モデルを用いた経口免疫療法と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明 27

富山大学・和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野

教 授 門 脇 真

助 教 山 本 武

II-2 食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討 34

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 小児科学

教授 足立 雄一

助教 伊藤 靖典

III. 富山発の自己免疫病治療薬の開発を目指した創薬研究：
TLR7 選択的阻害作用を持つ天然薬物シクロバクチオールの
実用化研究 40

III-1 シクロバクチオールとその合成誘導体による TLR7 阻害活性の試験管内及び
モデル動物，インシリコによる解析 43

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）免疫バイオ・創薬探索研究講座

客員教授 長井 良憲

客員准教授 渡邊 康春

協力研究員 岡本 直樹

III-2 自己免疫病患者由来免疫細胞を用いたシクロバクチオールの
臨床研究 45

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）内科学（一）

准教授 多喜博文

平成30年度

和漢薬・バイオテクノロジー受託研究報告書

研究代表者 富山大学大学院医学薬学研究部長 酒井 秀紀

まえがき

富山大学大学院医学薬学研究部と和漢医薬学総合研究所では、富山県のご配慮により遂行した『平成30年度「和漢薬・バイオテクノロジー受託研究」』において、3つの主要課題による研究成果を挙げることができました。これらの課題に取り組んだ研究班は、安東班、門脇班、長井班であり、各研究成果の概要は以下のとおりです。

安東研究班の研究テーマは、「車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬（薬用植物）の探索」です。この班は3名の研究者で構成され、安東氏は、「慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討」、小松氏は、「車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索」、服部氏は、「車前子成分のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析」というサブテーマで、それぞれの研究成果を報告しています。

門脇研究班の研究テーマは、「急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的治療法の創出—東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチ」です。この班は2名の研究者で構成され、門脇氏は、「病態モデルを用いた経口免疫療法と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明」、足立氏は、「食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討」というサブテーマで研究成果を報告しています。

長井研究班の研究テーマは、「富山県産の自己免疫病治療薬の開発を目指した創薬研究：TLR7 選択的阻害作用を持つ天然薬物シクロバクテオールの実用化研究」です。この班は2名の研究者で構成され、長井氏は、「シクロバクテオールとその合成誘導体による TLR7 阻害活性の試験管内及びモデル動物、インシリコによる解析」、多喜氏は、「自己免疫病患者由来免疫細胞を用いたシクロバクテオールの臨床研究」というサブテーマで研究成果を報告しています。

本年度は、車前子の有効成分の多角的解析、免疫療法と葛根湯の併用という東西医薬学を組み合わせた治療法の検討、シクロバクテオールの薬効の多階層的解析などが行われ、ユニークな成果が得られています。和漢薬やバイオテクノロジーの基礎研究により有効なシーズを見出し、その可能性を追究していくことは、富山大学の研究者の責務であると考えています。優れた基礎研究により創造・蓄積された成果が花開き、将来的に製品化や臨床応用されていくことを期待しています。そして、薬都富山のさらなる活性化につながればこの上ない喜びです。

最後になりましたが、本研究の実施にあたり、格段のご支援をいただきました富山県関係機関に深く感謝申し上げます。

平成 30 年度受託研究課題

班	研究者	研 究 課 題
I 車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬（薬用植物）の探索	I-1 安 東 嗣 修 歌 大 介	慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討
	I-2 小 松 かつ子 當 銘 一 文	車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索
	I-3 服 部 裕 一 大 橋 若 奈	車前子由来物質のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析
II 急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的治療法の創出 —東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチ—	II-1 門 脇 真 山 本 武	病態モデルを用いた経口免疫療法と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明
	II-2 足 立 雄 一 伊 藤 靖 典	食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討
III 富山発の自己免疫病治療薬の開発を目指した創薬研究:TLR7 選択的阻害作用を持つ天然薬物シクロバクチオールの実用化研究	III-1 長 井 良 憲 渡 邊 康 春 岡 本 直 樹	シクロバクチオールとその合成誘導体による TLR7 阻害活性の試験管内及びモデル動物、インシリコによる解析
	III-2 多 喜 博 文	自己免疫病患者由来免疫細胞を用いたシクロバクチオールの臨床研究

I. 車前子成分の神経障害性疼痛抑制効果と富山県産ブランド化に向けた有効成分の豊富な生薬（薬用植物）の探索

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学	准教授	安東 嗣修
（同）	助教	歌 大介
富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野	教授	小松 かつ子
（同）	准教授	當 銘 一文
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）分子医科薬理学	教授	服部 裕一
（同）	助教	大橋 若奈

末梢神経障害性疼痛の中でも抗がん薬によって誘発される末梢神経障害性疼痛の発生は、抗がん薬投与の休薬の指標となっていることに加え、がん患者の QOL の著しい低下にも繋がっている。従って、この末梢神経障害性疼痛のコントロールは非常に重要である。

これまでに、漢方方剤の牛車腎気丸は抗がん薬パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛に有効であること、その漢方方剤の構成生薬の一つである車前子の成分に活性があることを見出してきた。更にその後の研究から車前子成分の一つであるアウクビンが抗がん薬パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛の憎悪を抑制し、一次感覚神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞の障害を保護することも明らかにしてきた。更に昨年は、抗がん薬オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアもアウクビンが抑制することを見出した。

そこで、本年の研究では、オキサリプラチン誘発の末梢神経障害性疼痛に対するアウクビンの抑制作用機序の解明、アウクビン以外の車前子の有効成分の解析、更には富山県で採取したオオバコの種子（車前子）中のアウクビン含有量の解析を行った。

【各班のまとめ】

1. 慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討（応用薬理学：安東嗣修，歌 大介）

マウスへ抗がん薬オキサリプラチンを投与すると、疼痛様反応である機械的アロディニアが生じ、アウクビンの連続投与により機械的アロディニアが抑制される。本研究では、アウクビンによるオキサリプラチン誘発機械的アロディニアの抑制作用機序に一次感覚神経のシュワン細胞への障害抑制や脊髄後角でのミクログリアの活性が関与しないこと、その一方で、脊髄アストロサイトの活性化制

御が関与することを見出した。従って、アウクビンのオキサリプラチンによる機械的アロディニアの抑制に、脊髄アストロサイトの活性化抑制が関与することが示唆される。

オキサリプラチン投与患者の末梢神経障害の特徴に冷刺激に対する不快異常感覚の増大が認められる。アウクビンは、この冷刺激による不快異常感覚の憎悪を抑制した。この不快異常感覚には温度感受性イオンチャネル TRPM8 が関与しているが、アウクビンはその発現を抑制しなかった。従って、TRPM8 の感受性低下やそのほかの機序が、アウクビンによる冷刺激誘発不快異常感覚の抑制に寄与している可能性が示唆される。

2. 車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索（生薬資源科学：小松かつ子，當銘一文）

車前子中のアウクビン以外の有効成分の探索において、pedicularis-lactone を含む画分で抗アロディニア効果が認められた。しかし、pedicularis-lactone そのものが抗アロディニア効果を示すか不明であった。しかし、車前子から pedicularis-lactone を動物実験で使用できる量を確保することは難しい。そこで、pedicularis-lactone を多く含む生薬を探索し、蔓荊子を見出し、現在成分の分画を進めている。今後、本 pedicularis-lactone を用いて動物実験を行う予定である。

次に車前子エキスの経口投与による血中の車前子エキス由来化合物の検出を行った。アウクビンは血中で検出できたが pedicularis-lactone は検出できなかった。このことから、アウクビンはそのまま生理活性を示し、pedicularis-lactone は代謝物が生理活性を示す可能性を見出した。

アウクビンや pedicularis-lactone を多く含む車前子の探索では、本年は富山県内（富山市池田，富山市杉谷，立山町利田）で採取したオオバコの種子（車前子）を用いてアウクビンや pedicularis-lactone の含有量の解析を行った。その結果、アウクビンは検出されたが pedicularis-lactone はほとんど検出されなかった。その含有量に関しては、文献値と比較すると少なく、今後他の地域のオオバコを採取し、アウクビンや pedicularis-lactone を多く含む種を見出す。

3. 車前子成分のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析(分子医科薬理学:服部裕一，大橋若奈)

抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛を含む多くの神経障害性疼痛には、脊髄のミクログリアやアストロサイトが重要な役割を担っていることが知られている。研究代表者らのマウスを用いた検討から、オキサリプラチン誘発の末梢神経障害性疼痛に脊髄アストロサイトの活性化が関与することが明らかとなった。そこで、本研究では、アストロサイト活性化へのアウクビンの効果を検討した。オキサリプラチンは、アストロサイトへ作用し、炎症性サイトカインの IL-1 β mRNA の発現を増加させたが、

アストロサイトの活性化の指標である GFAP mRNA の発現や他の炎症性サイトカイン (IL-6, TNF α , MCP-1 mRNA) を増加させなかった。オキサリプラチン刺激による IL-1 β mRNA 発現増加は、アウクビンによって抑制されなかった。以上の結果から、マウスにおける脊髄アストロサイトの活性化及びアウクビンの効果は、アストロサイトへの直接作用でないことが示めされ、他の細胞及びメディエーターを介していることが示唆される。

I-1 慢性疼痛動物モデルを用いた車前子成分の有効性の行動薬理学および電気生理学的検討

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学 准教授 安東 嗣 修
（同） 助 教 歌 大 介

【研究目的】

抗がん薬によるがん化学療法は、がん患者のがん治療に重要である。しかし、患者のQOL（生活の質）を著しく低下させ、さらに投薬中止の措置が取られ、既存に鎮痛薬や鎮痛補助薬ではコントロールが難しい副作用である末梢神経障害（しびれや疼痛などであり、投薬を中止してもその症状は、1年以上続くこともある）が、現在問題となっている。従って、抗がん薬による末梢神経障害のコントロールは、非常に重要であるが、有用な予防・治療学がないのが現状である。そこで、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

我々は、漢方方剤の牛車腎気丸（地黄、牛膝、山茱萸、山薬、車前子、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂皮、附子）、更には、その構成生薬の車前子の成分に、抗がん薬パクリタキセル誘発の機械的アロディニア（健常では感じない程度の刺激に対して過敏になっている状態）の憎悪抑制作用を抑制する効果があることを見出した。更に、車前子の成分であるアウクビンにパクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪抑制作用があることを明らかにした。また、アウクビンは、末梢神経の有髄神経の髄鞘の形成に関与するシュワン細胞におけるパクリタキセルによって誘発される小胞体ストレスに対して抑制効果することも見出した。

末梢神経障害を誘発代表的な抗がん薬には、パクリタキセルの他に、オキサリプラチン、ビンクリスチン、ボルテゾミブが知られている。昨年、アウクビンの連続投与が、オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアの憎悪を抑制し、ビンクリスチンやボルテゾミブ誘発のアロディニアを抑制しないことを見出した。また、オキサリプラチン投与患者の症状の一つに冷たい刺激に対して過敏になっていることが知られていることから、マウスモデルを用いて、冷刺激に対する不快異常感覚へのアウクビンの効果を検討したところ、抑制傾向を示した。

そこで、本研究では、オキサリプラチン誘発機械的アロディニア及び冷刺激誘発不快異常感覚に対するアウクビンの憎悪抑制作用機序の解明を試みた。

【研究方法】

(実験動物)

実験には、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。

(抗がん薬)

オキサリプラチン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、5%糖液に溶解し、3 mg/kg の用量で単回腹腔内注射した。

(アウクビン)

アウクビン (50 mg/kg) 和光純薬工業, 大阪) は、生理食塩水に溶解し、抗がん薬投与翌日より 1 日 1 回腹腔内注射した。

(行動評価)

機械的アロディニアの評価は、マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント (0.69mN) を適用し、この機械的刺激に対する後肢の反応を 3 段階のスコア化 (0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動, 1: 後肢の引き上げ行動 (lifting), 2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)) し、評価した。冷刺激による不快異常感覚は、マウス後肢足蹠にアセトン塗布し、塗布直後の反応 (評価しない) に続く後肢の反応を 3 段階のスコア化 (0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動, 1: 後肢の引き上げ行動 (lifting), 2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)) し、評価した。

(免疫組織化学的染色)

オキサリプラチン投与 10 日後のマウス脊髄を用いて、蛍光免疫染色を行った。染色には、ミクログリアのマーカーである Iba1 及びアストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて行った。蛍光組織観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (富山大学生命科学先端研究支援ユニット遺伝子実験施設) を用いて観察した。

(リアルタイム PCR)

オキサリプラチン投与 3 日後のマウス後根神経節より、常法に従い total RNA を抽出し、cDNA を作製後、以下のプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。

プライマー : TRPM8, 5'-ggctggagatgagattgtgag-3' (sense) and 5'-gctgaagtgggtggagaaga-3' (antisense); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 5'-ccaaggtcatcatgacaac-3' (sense) and 5'-ttactccttgaggccacgt-3'

(antisense).

(細胞培養)

シュワン細胞株 (LY-PPB6) 及び結腸癌細胞株 (CMT93) は, 10% FBS 含有 DMEM で培養した。

(細胞障害性試験)

CMT93 細胞における細胞障害性試験は, LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ) を用いて行った。

(ウエスタンブロッティング)

LY-PPB6 における小胞体ストレスマーカーCHOP の発現は, ウエスタンブロッティングにより行った。

【結果】

(1) シュワン細胞へのオキサリプラチン投与における小胞体ストレス

パクリタキセルは, シュワン細胞株 LY-PPB6 細胞に対して, 小胞体ストレスマーカーの CHOP の発現を増加させる。そこで, オキサリプラチンを LY-PPB6 細胞に作用させると, CHOP の発現を誘導しなかった。

(2) オキサリプラチン投与マウス脊髄後角におけるアストロサイト及びミクログリアの活性化とアウクビンの効果

オキサリプラチンの投与により, 脊髄後角におけるミクログリアの活性化は観察さなかったが, アストロサイトの活性化が観察された。このアストロサイトの活性化は, アウクビンの連投により抑制された。

(3) オキサリプラチン投与により誘発される冷刺激に対する不快異常感覚へのアウクビンの効果

昨年度, オキサリプラチン投与により誘発される冷刺激に対する不快異常感覚に関して, アウクビンの連続投与が抑制傾向を示したため, 再度検討した。その結果, アウクビンの連続投与は, オキサリプラチン誘発冷不快異常感覚の憎悪を有意に抑制した。

(4) オキサリプラチン誘発 TRPM8 mRNA 発現誘導へのアウクビンの効果

冷刺激に対して応答する温度感受性イオンチャンネルに TRPM8 がある。これまでにオキサリプラチン投与により、一次感覚神経の細胞体が集合している後根神経節において TRPM8 mRNA の発現が増加することを報告してきた。この増加に対して、アウクビンの連続投与は、オキサリプラチン投与による TRPM8 mRNA 発現増加に影響しなかった。

(5) オキサリプラチンによる結腸がん細胞 (CMT93) への細胞毒性へのアウクビンの効果

オキサリプラチンは、大腸がん(結腸, 直腸)に用いられる抗がん薬である。そこで、アウクビンがオキサリプラチンによる結腸がん細胞 (CMT93) への細胞毒性に対して影響があるかどうか検討した。その結果、オキサリプラチン (500 μ M) 誘発の CMT93 細胞への細胞毒性に対して、アウクビン (25-500 μ M) は影響しなかった。

【考察と今後の展望】

これまでオキサリプラチン誘発機械的アロディニアに対して車前子成分アウクビンが有効であること、その機序にマスト細胞が関与していないことを明らかにした。これまで、パクリタキセル誘発機械的アロディニアに、末梢神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞のパクリタキセルによる障害(小胞体ストレス)が関与すること、このパクリタキセル誘発小胞体ストレスをアウクビンが抑制することを見出だしてきた。そこで、オキサリプラチンがシュワン細胞に小胞体ストレスを誘発するか、そのマーカーである CHOP の発現を指標に調べたところ、オキサリプラチンは CHOP の発現を誘導しなかった。このことから、パクリタキセル誘発機械的アロディニアに、末梢神経のシュワン細胞の障害が関与しないことが示唆される。次に、様々な神経障害性疼痛の発症に関与する脊髄後角のミクログリア並びにアストロサイトに着目し、アウクビンのオキサリプラチン誘発末梢神経障害性機械的アロディニアの抑制作用これら細胞が関与するか検討した。オキサリプラチン投与により、脊髄ミクログリアの活性化は認められなかった。その一方で、アストロサイトの活性化が認められた。アストロサイトの活性化は、活性化ミクログリアからの IL-1 β や IL-6 等の炎症性サイトカインが関与するが、オキサリプラチン投与マウスではミクログリアの活性化は認められなかったことから、アストロサイトの活性化にこれらサイトカインの関与は小さいと考えられる。アストロサイト活性化には、ミクログリアの活性化だけでなく一次感覚神経からのサブスタンス P 等の伝達物質の関与も知られている。今後解析は必要であるが、オキサリプラチン投与によるアストロサイトの活性化に一次感覚神経からの伝達物質が関与している可能性が示唆される。本研究では、オキサリプラチン投与によるアストロサイトの活性化が、アウクビンの投与により抑制された。今回、アウクビンによるアストロサイトの活性化抑制作用機序の解明まで行えていないが、アウクビンによるアストロサイトの活性化の抑制や一次感覚神経から遊離される伝達物質及び関連受容体の発現制御等がアストロサイトの活性化抑制作用に

寄与する可能性がある。今後、本仮説を検証する予定である。

オキサリプラチンの末梢神経障害の特徴に冷刺激に対して過敏となる不快異常感覚がある。昨年の研究では、本冷刺激に対する不快異常感覚にアウクビンによる抑制効果が小さいことを報告した。再度本年、アウクビンの効果を検討したところ、コントロール群比べ有意にオキサリプラチン投与マウスにおける冷刺激に対する不快異常感覚をアウクビンが抑制した。昨年との違いは、冷刺激に対する薬効評価の技術の向上と考えられる。ところで、オキサリプラチン投与による冷刺激に対する不快異常感覚の誘発には、温度感受性チャネルの TRPM8 が関与することを我々は報告してきた。一次感覚神経の細胞体が集合する後根神経節において、オキサリプラチン投与により TRPM8 mRNA の発現が増加したが、アウクビンはその発現に影響しなかった。アウクビンが、TRPM8 の発現以外に、TRPM8 の感受性に影響するのか、それとも他のメカニズムが関与するのか、今後明らかにする予定である。

アウクビンを今後、がん患者に使用するにあたり、抗がん薬の抗がん作用に影響しないことが重要である。そこで、オキサリプラチンが主に消化器がんで使用されることから、結腸がん細胞を用いて検討した。アウクビンは、オキサリプラチンによる結腸がん細胞の細胞死に影響しなかった。したがって、アウクビンは、オキサリプラチン投与患者への使用が可能であることが示唆される。

今後、アウクビンによる末梢神経障害の機序の解明並びに、現在進めている車前子抽出画分のアウクビン以外の活性成分の有効性を検討し、さらに、抗がん薬のみならず、他の神経障害性疼痛に有効であるかも検討する予定である。

【学会発表】

- 1) 安東嗣修. 不快な異常感覚制御に向けた和漢薬及び活性成分の探索と作用機序の解明並びに臨床利用への展開. 第 35 回和漢医薬学会学術大会; 2018 Sep 1-2; 岐阜 (学術貢献賞受賞講演)
- 2) Maesaka M, Toume K, Komotsu K, Uta D, Kume T, Andoh T. Prophylactic repetitive administration of aucubin attenuates oxaliplatin-induced mechanical allodynia through the inhibition of spinal astrocyte activation. The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa pharmaceutical Network (3rd TAA-Pham Symposium); 2018 Sep 10-12; Toyama
- 3) 前坂未紀, 當銘一文, 小松かつ子, 歌大介, 久米利明, 安東嗣修. Oxaliplatin 誘発末梢神経障害性機械的 allodynia に対する aucubin の効果. 痛み研究会 2018「痛みを中心とする有害状況適応の神経戦略バイオロジー」平成 30 年度生理研研究会; 2018 Dec 13-14; 愛知

【受賞】

- 1) 安東 嗣修. 和漢薬学会学術貢献賞. 不快な異常感覚制御に向けた和漢薬及び活性成分の探索と作用機序の解明並びに臨床利用への展開. 第 35 回和漢医薬学会学術大会; 2018 Sep 1-2; 岐阜

【企業面談】

富山県内製薬関連企業 S 社と 2019 年 1 月 29 日に面談を行い，車前子成分の外用剤の開発に関して議論した。

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学 前坂 未紀

I-2 車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制作用成分の 同定と有効成分含有生薬（薬用植物）の探索

富山大学・和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 小松 かつ子
(同) 當 銘 一 文

【背景・目的】

抗がん薬によるがん化学療法は、がん疾患における重要な治療法の1つである。しかし、副作用として嘔吐、疼痛、痺れなどの末梢神経障害が生じ大きな問題となっている。抗がん薬による末梢神経障害は比較的高頻度で出現し、その発現や増悪により患者のQOLが著しく低下する。さらに症状が悪化すれば、抗がん薬の減薬や治療中止につながる場合もある。また、この末梢神経障害は、抗がん薬治療の終了後においても継続することが多く、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬による改善が非常に難しいことから、新たな予防・治療法の開発が強く求められている。

10種の生薬により構成される漢方方剤 牛車腎気丸は、主に下肢痛、腰痛、しびれなどのほか排尿障害に適応を有し、糖尿病性末梢神経障害にも用いられている。さらに近年、本方剤は抗がん薬による末梢神経障害の改善を目的として用いられるようになってきた¹。

これまでに、安東らはマウスへの抗がん薬パクリタキセルの投与により疼痛様反応（機械的アロディニア）が生じることを見出した。また、漢方方剤の牛車腎気丸（1.0 g/kg）の連続投与により本疼痛様反応の発生が抑制されること、牛車腎気丸の構成生薬のうち、車前子及び牛膝が含まれない八味地黄丸（0.1 - 1.0 g/kg）、六味丸（0.1 - 1.0 g/kg）の投与では抑制されないことを明らかにした²。この結果より、牛車腎気丸に用いられる車前子及び牛

膝に疼痛様行動を抑制する有効成分が含まれていることが示唆されたため、両者の作用を検討した。その結果、車前子の熱水抽出物（0.03 - 0.3 g/kg）の連続投与は、パクリタキセル誘発機械的アロディ

表1 牛車腎気丸関連方剤と構成生薬

生薬名	牛車腎気丸	八味地黄丸	六味丸
地黄	5 - 8	5	5 - 6
山茱萸	2 - 4	3	3
山薬	2 - 4	3	3
沢瀉	3	3	3
茯苓	3 - 4	3	3
牡丹皮	3	3	3
桂皮	1 - 2	1	
加工附子	0.5 - 1	0.5 - 1	
牛膝	2 - 3		
車前子	2 - 3		
	+	-	-

数字は一日分の量を示す(g)

下段の+は抗アロディニア作用があることを示す。

ニアを抑制する一方で、牛膝の熱水抽出物 (0.03 - 0.3 g/kg) の連続投与では抑制されなかった。この結果より、抗アロディニア作用を有する成分は車前子に含まれていることが示唆された³。

車前子はオオバコ *Plantago asiatica* Linné (オオバコ科 Plantaginaceae) の種子を基原とする生薬であり⁴、これまでに成分に関する報告はあるものの、鎮痛作用、神経障害性疼痛の抑制作用に着目した成分の報告はなかった。昨年度までに車前子に含まれる末梢神経障害性疼痛抑制成分を明らかにする目的で、マウスモデルによる抗アロディニア作用を指標として、成分分画を進め、活性画分から 4 種のイリドイド化合物の同定に成功した [aucubin (1), geniposidic acid (2), pedicularis-lactone (3), iridolactone (4)]。このうちイリドイド配糖体である 1 及びイリドイド 3 を主に含む画分は、30 mg/kg 及び 100 mg/mL の経口投与で有意に抗アロディニア作用を示すことを明らかにした。

本研究では上記を踏まえ、3 を効率的に精製し、薬理作用の解析に用いるべく、3 を含む植物材料、生薬材料の探索を行った。また、昨年度までに未解決であった、抗アロディニア作用を示した 3 を主に含む画分中の 3 の含量を定量するとともに、車前子を投与したマウスの血漿中における車前子成分の移行性について解析を行った。

【方法】

化合物 3 を含む植物材料、生薬材料の探索

生薬「玄参」(中国浙江省産)、「蔓荆子」(中国広西壮族自治区産)は栃本天海堂から購入した。それぞれの抽出は 3 の単離に関する既報を参考に抽出、分画を行った。

玄参：100 g の生薬を、50%MeOH を用い、400 mL、30 分間、超音波処理を行い 3 回抽出した。その後、シリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) にて酢酸エチル、メタノール、水の混合溶媒にて溶出し画分を得た。

蔓荆子：100 g の生薬を、ヘキサン 400 mL を用い、30 分間、超音波にて脱脂した。その後残渣を MeOH 400 mL にて 30 分間、超音波処理を行い 3 回抽出した。その後、シリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) にて酢酸エチル、メタノール、水の混合溶媒にて溶出し画分を得た。

それぞれ得られた抽出物、及びシリカゲル分画物について、下記の条件にて LCMS による分析を行った。

富山県で採取したオオバコ種子の分析

富山県内の 3 か所 (富山市池田、富山市杉谷、立山町利田) にて採取したオオバコ種子をすり鉢で粉碎し、得られた粉末を熱水中、30 分間抽出した。得られた抽出物を、さらにシリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) に付し、EtOAc : MeOH : H₂O 5:1:0.5 ~ MeOH により溶出した画分について LCMS 分析を行った。アウクビンの定量は、標品として市販のアウクビン標準品 (和光) を用い、絶対検量

線法にて行った。ピークの検出は UV 190 nm, ネガティブモードの MS における m/z 391 のシグナルを用いた。

LCMS 分析条件

LCMS システムは、島津製作所製 Prominence HPLC システム及び LCMS-IT-TOF を用いた。分析条件は以下のとおり。

Column: Develosil C30-UG-5 (5 μ m, 2.0 \times 150 mm), flow rate: 0.2 mL/min.

Solvent system: A; water with 0.1% formic acid, B; MeCN with 0.1% formic acid,

1% B (0-5min), 1-10% B (5-15 min), 10-35% B (15-25 min), 35-100% B (25-30 min), 100% B (30-40 min), 100-1% B (40-40.5 min), 1% B (40.5-50 min).

Sample injection: 5 μ L

Detection: 190-400 nm for UV, m/z 150-1000 for MS.

蔓荊子における 3 の探索

化合物 3 の単離を目的に、蔓荊子からの成分の探索を行った。既報⁵に従い、粉碎した蔓荊子 700 g をヘキサン (3 L, 3 回, 超音波 30 分) で抽出し, 残渣をさらに, メタノール (3 L, 3 回, 超音波 30 分) で抽出した。得られたメタノール抽出物 8.1 g のうち, 7.3 g をシリカゲルカラム (ワコーゲル C-300HG) に付し, 酢酸エチル, メタノール, 水の混合溶媒で溶出させた。このうち, 3 の存在を LCMS にて確認した画分 (0.38 g, EtOAc : MeOH : H₂O 20:1:0 ~ 10:1:1 にて溶出) についてさらにシリカゲルカラム (ワコーゲル C-400HG) に付し, クロロホルム, メタノール, 水の混合溶媒で溶出させた。3 の存在を LCMS にて確認した画分 (9 mg, CHCl₃ : MeOH : H₂O 92:8:0.1 にて溶出) についてさらに ODS オープンカラムにて分画を行った。

定量 ¹H NMR

試料及び試薬は, 精密天秤 (ウルトラマイクロ天秤 MSA2.7S, ザルトリウス社製) にて精密に秤量した。定量 NMR 用の DSS [Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3-*d*₆-sulfonate] を 10 mg 精密に秤量し, 20 mL の NMR 用重水 (D₂O) に溶解させ内標準液を調製した。秤量した試料を 1 mL の内標準液に溶解させ, NMR 用試料とした。このうち 0.7 mL を NMR 測定管に分注し, 定量 ¹H NMR 用のパルスシーケンス [フリップ角 : 90°, パルス繰り返し時間 : 64 秒 (データ取り込み時間 4 秒), デジタル分解能 : 0.25 Hz, サンプル回転 : 無し, ¹³C デカップリング : 有り, 積算回数 : 8 回, 測定温度 : 25°C] で測定を行った。試料は 3 回調製し, それぞれの試料について測定を 1 回行った。3 回の測定値の平均を定量値とした。

LCMSによる経口投与後の血中車前子由来化合物の解析

栃本天海堂にて購入した車前子(中国江蘇省産) 100 gを800 mLの精製水を用い、2回熱水抽出し、車前子エキスを調製した。車前子エキスは、5%アラビアゴムを用いて懸濁液を調製し、雄性 C57BL/6 マウスに1 g/kgの用量で1日1回、5日間連続して経口投与し、最終投与の1時間後に採血を行った。得られた血液に、等量のヘパリンを加え混合した後、遠心分離を行い、血漿サンプルを得た。

血漿サンプルは以下の前処理を行った。血漿サンプルに0.05%のギ酸を含むメタノール溶液を4倍量添加し、ボルテックスミキサーにて5分間攪拌した。10分静置した後、4°C、10500 rpmで10分間遠心分離を行い、得られた上清をさらにAmicon Ultra (10K)により限外ろ過処理した。得られたろ液は、遠心エバポレーターを用いた減圧濃縮による溶媒留去を行った。最終的に乾燥した試料を超純水50 µLにて溶解し、4°C、10500 rpmで10分間遠心分離を行い、得られた上清をLCMSの試料とした。

【結果及び考察】

車前子の抗アロディニア作用成分一つとして昨年度推定した化合物**3**の抗アロディニア作用は、本化合物を主に含む画分を用いて行った動物実験結果であり、精製した化合物を用いての実験ではなかった。本化合物は市販されておらず、正確な薬理作用の解析のためには、精製した**3**を得ることが必須である。そこで、本研究では、**3**を高含量に含む植物材料、生薬材料の探索を行った。文献調査の結果、シオガマグク属植物 *Pedicularis chinensis* (ハマウツボ科 *Orobanchaceae*) の根⁶及び生薬「玄参」の基原であるゴマノハグサ *Scrophularia buergeriana* (ゴマノハグサ科 *Scrophulariaceae*) の根⁷、生薬「蔓荊子」の基原であるハマゴウ *Vitex rotundifolia* (クマツヅラ科 *Vervencaceae*) の果実⁵などからの単離の報告があった。

このうち市販の生薬「玄参」及び「蔓荊子」を入手し、その抽出物について**3**の検出をLCMS分析にて試みたが、検出はできなかった。そこで、それぞれの抽出物について、シリカゲルを用い、**3**の分離が可能な条件にてカラム分画を行い、得られた画分についてLCMS分析を行った。その結果、蔓荊子の分画物においてのみ**3**の検出が可能であった。

そこで、市場品の蔓荊子(中国広西壮族自治区産)を用い、**3**の単離を目的に成分の分画を行った。既報⁵に従い、粉碎した蔓荊子をヘキサンにて脱脂し、残渣をメタノールにて抽出した。得られたメタノール抽出物をシリカゲルカラムにより分画し、**3**の存在をLCMSにて確認した画分について、さらにシリカゲルカラムにて分画した。LCMSにて**3**の存在を確認した画分をさらにODSカラムにて分画し、得られたフラクションの¹H NMRを測定したところ、**3**のシグナルが確認された。しかし、1 mg以下と少なく、まだ不純物を含んでいた。これ以上の分離・精製は困難と考え、スケールアップをして同様の操作を行うべく、10倍量の蔓荊子(7 kg)を用い、化合物の分離・精製を進めている。今後、

分画法を改良するなどして、動物実験に必要な 300 mg 以上の **3** を得て、薬理試験に供する予定である。

富山県で採取したオオバコ種子の分析

車前子の基原植物となるオオバコは、アジア地域に広く分布する。富山県内にも公園や舗装されていない道路脇など、至る所に生育が見られる。そこで、富山県内の 3 か所（富山市池田、富山市杉谷、立山町利田）にて採取したオオバコ (*Plantago asiatica*) 種子の抽出物について、抗アロディニア作用をもつ **1** 及び **3** の分析を行った。今回行った条件では、**3** は検出されなかった。一方で、**1** は、UV 検出による定量では乾燥重量当たり 0.04-0.09%、LCMS による定量では 0.09-0.13% 含まれることがわかった。Wang らは、*Plantago asiatica* の種子に約 0.2%（乾燥重量当たり）含まれることを報告⁸している。今回の実験から、富山県内にて採取したオオバコ中には **1** が含まれることがわかったが、文献報告値と比較すると特別その含量が高いわけではないことが予想された。今後、市販の車前子を購入するとともに、国内の他地域のオオバコ種子を収集し、**1** 及び **3** の含量を調べることを計画している。

3 を主に含む抗アロディニア作用を示す画分の定量 ¹H NMR

昨年度の実験において、有意な抗アロディニア作用が認められた **3** を主に含む画分について、定量 ¹H NMR による検討を行った。定量にはピークの分離が良好であった 7 位の水素のシグナルを用いた。予想に反して、この画分中の **3** の含量は 13.4% と低値であった。¹H NMR においては、本化合物のシグナルが主要であることを確認している。¹H NMR においては、分子中に水素をもつ化合物は検出されるが、水素を持たない化合物は検出されないため、この画分には、ミネラル成分などの ¹H NMR で検出されない成分が含まれる可能性が考えられた。

血漿中の車前子由来化合物の解析

車前子熱水抽出物をマウスに経口投与（1 g/kg, 1 日 1 回, 5 日間）して得た血漿サンプルにおいては、**1**, **2** が検出された。一方で、**3**, **4** は検出されなかった。

1 は、化合物単独の腹腔内投与⁹ 及び経口投与において抗アロディニア作用を示すことを明らかにしている。本化合物が血中において代謝を受けることなく存在していることは、本化合物の薬理活性及び体内動態に関して有用な知見であると考えられる。

また、抗アロディニア作用を示した **3** を主に含む画分（FR3）を経口投与（100 mg/kg, 14 日間）したマウスの血漿サンプルにおいては、**3** は検出されなかった。**3** はこれまでの LCMS 分析において、**1**, **2** と比較して検出感度が低いことがわかっている。そのため、**3** を主に含む画分（FR3）を投与したマウスの血漿サンプルにおいては、**3** が吸収された後、代謝を受けて変化を起こすこと、もしくは

は存在しているものの、今回の実験では検出できていない可能性が考えられた。

【結論】

現在有効な対処法がない抗がん剤による末梢神経障害性疼痛の新たな治療法・予防法を見出すことを目的に、これまでに牛車腎気丸の構成生薬である車前子から抗アロディニア作用成分としてイリド化合物 **1** 及び **3** を見出している。**3** は未精製の画分を用いて薬理作用を解析していたため、精製された **3** を得て、薬理活性試験へ供する目的で、**3** を含む生薬の探索を行った。その結果、生薬「蔓荊子」に **3** が含まれていることがわかり、現在その分画を鋭意進めている。車前子投与による血漿の解析においては、車前子熱水抽出物の経口投与により抗アロディニア作用を示す **1** が、血中にそのまま移行することが確認できたが、**3** は確認できず、代謝されている可能性も考えられた。車前子の抗アロディニア作用が **1** のみならず **3** またはその代謝物によるものであることがわかれば、車前子エキスとしての有用性を提示できるものであり、興味深い。

【研究協力者】

Yu Huanhuan 富山大学大学院医学薬学教育部(薬学) 博士後期課程2年 (生薬資源科学分野)
花澤 志帆 富山大学薬学部 5年 (生薬資源科学分野)

【参考文献】

1. Yamamoto, T.; Murai, T.; Ueda, M.; Katsuura, M.; Oishi, M.; Miwa, Y.; Okamoto, Y.; Uejima, E.; Taguchi, T.; Noguchi, S.; Kurokawa, N. [Clinical features of paclitaxel-induced peripheral neuropathy and role of Gosya-jinki-gan (article in Japanese: 邦題 Paclitaxel による末梢神経障害の臨床的特徴と牛車腎気丸の役割)]. *Gan To Kagaku Ryoho* **2009**, 36, 89-92.
2. Andoh, T.; Kitamura, R.; Fushimi, H.; Komatsu, K.; Shibahara, N.; Kuraishi, Y. Effects of goshajinkigan, hachimijiogan, and rokumigan on mechanical allodynia induced by Paclitaxel in mice. *J Tradit Complement Med*. **2014**, 4, 293-7.
3. Andoh, T.; Kato, M.; Kitamura, R.; Mizoguchi, S.; Uta, D.; Toume, K.; Komatsu, K.; Kuraishi, Y. Prophylactic administration of an extract from Plantaginis Semen and its major component aucubin inhibits mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice. *J Tradit Complement Med*. **2016**, 6, 305-308.
4. Ministry of Health, Labour and Welfare, *The Japanese Pharmacopoeia, 17th edn*. **2016**, p 1517.
5. Ono, M.; Ito, Y.; Kubo, S.; Nohara, T. Two new iridoids from *Viticis trifoliae* Fructus (fruit of *Vitex rotundifolia* L.). *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 1094-1096.
6. Li, Y.; Changzeng, W.; Zhongjian, J. Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. *Phytochemistry* **1995**, 40, 491-494.

7. Lin, S.J.; Tan, C.H.; Jiang, S.H.; Li, Y.M.; Zhu, D.Y. C9-iridoids from *Scrophularia buergeriana*. *Helv Chim Acta* **2006**, *89*, 2789-2793.
8. Wang, D.; Qi, M.; Yang, Q.; Tong, R.; Wang, R.; Bligh, S.W.; Yang, L.; Wang, Z. Comprehensive metabolite profiling of Plantaginis Semen using ultra high performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with elevated energy technique. *J Sep Sci.* **2016**, *39*, 1842-52.
9. Andoh, T.; Uta, D.; Kato, M.; Toume, K.; Komatsu, K.; Kuraishi, Y. Prophylactic Administration of Aucubin Inhibits Paclitaxel-Induced Mechanical Allodynia via the Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress in Peripheral Schwann Cells. *Biol Pharm Bull.* **2017**, *40*, 473-478.

【学会発表など】

1. Yu HH, Hou ZY, Toume K, Kato M, Maesaka M, Anhdo T, Komatsu K. Discovery of anti-allodynic compounds from the seeds of *Plantago asiatica*, a ingredient of Kampo formula “Goshajinkigan” 2018 Joint seminar between Institute of Natural medicine at University of Toyama and Natural product research Institute at Seoul Natinal University; **2018**, 11, 5; Seoul, Korea.
2. Toume K., Yu H. H., Hou Z. Y., Andoh T., Kato M., Maesaka M., Komatsu K. Exploration of anti-allodynic compounds from the seeds of *Plantago asiatica*, an ingredient of Kampo formula ‘Goshajinkigan’. The 3rd Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network Symposium; **2018**, 9, 10-12; Toyama, Japan.
3. Toume K. Challenge by Kampo medicine (Japanese traditional medicine) for overcoming difficulties in modern medicine: Search for anti-allodynic components from Plantaginis Semen that inhibit paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 2018 Symposium on traditional medicine and primary healthcare in Toyama and Myanmar; **2018**, 6, 25 ; Toyama.

I-3 車前子由来物質のグリア細胞を介した 疼痛伝達制御の分子メカニズム解析

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 分子医科薬理学 教授 服部 裕一
（同） 助教 大橋 若奈

【研究目的】

末梢神経障害は抗がん剤治療に伴う副作用の一つであり、休薬の指標として抗がん剤治療を妨げるのみならず、休薬の後も症状の持続が認められ生活の質をも大きく低下させる要因となっている。緩和と治療薬の開発が求められているものの、有効な治療法に乏しいのが現状である。抗がん剤の一種であるパクリタキセルも末梢神経障害の副作用を持つ。パクリタキセル誘発性末梢神経障害には、マクロファージを介した機構が考えられている。マクロファージの細胞膜上に発現する自然免疫受容体にパクリタキセルはリガンドとして作用し活性化を促し、マクロファージから炎症性サイトカインをはじめとした種々の炎症性メディエーターが産生され、これが末梢神経障害の増悪に寄与しているとの機構である。興味深いことに、マクロファージは末梢組織のみならず中枢にも存在し、これはミクログリアと呼ばれている。モデルマウスを用いた検討から、パクリタキセル誘導性末梢神経障害には中枢系の寄与が示唆されており、中枢においてはパクリタキセルのミクログリアを介した機構が末梢神経障害に関与しうる可能性が浮かび上がる。本研究では、パクリタキセルの神経障害誘導の中枢での機構について解析を実施する。

牛車腎気丸は抗がん剤投与による末梢神経障害の緩和に有効であることが報告されている。この有効性は、牛車腎気丸から車前子と牛膝を除いた八味地黄丸ではほとんど報告されていないことから、末梢神経障害の緩和には、車前子または牛膝由来成分の関与が示唆される。研究代表者の安東らは、車前子には神経障害性疼痛の軽減作用があることを報告し、その有効成分としてアウクビンを同定している。本研究にて、中枢で末梢神経障害誘導応答に対する、車前子由来成分であるアウクビンの効果を明らかにすることを目的として、グリア細胞の炎症応答へのアウクビンの抑制効果について検証を行う。昨年度は、マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞を用いた検討から、パクリタキセルがミクログリアに直接作用し、炎症性サイトカイン、一酸化窒素といった炎症性物質の放出を促し炎症応答を誘導することを見出した。すなわち、パクリタキセルはミクログリアからの神経障害性物質の産生誘導を介して神経障害作用を発揮している可能性が示唆された。アウクビンは、パクリタキセルによるミクログリアの炎症応答には影響しなかったことから、アウクビンはミクログリアとは異なる

細胞に作用して、神経障害性疼痛抑制作用を発揮している可能性が浮上した。神経障害性疼痛の発現には、中枢においては、ミクログリアに加えて、アストロサイトが重要な役割を果たしている。そこで、本年度は、アストロサイト介在性の神経障害性疼痛機構におけるアウクビンの寄与について解析を実施した。

【方法】

(アストロサイト細胞株)

ヒト由来アストロサイト細胞株 U-251MG 細胞は、医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。10%のウシ胎仔血清を含んだ E-MEM 培地 (051-07615, 富士フィルム和光純薬) にて 37 度 5%二酸化炭素環境下で培養を行った。

(ミクログリア細胞株)

マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞は理研 BRC より入手した。10%のウシ胎仔血清、10 µg/ml のウシインシュリンと 100 µM の 2-メルカプトエタノールを含んだダルベッコ変法イーグル培地にて 37 度 5%二酸化炭素環境下で培養を行い、継代数 20 以下の細胞を実験に用いた。

(試薬)

オキサリプラチン (156-02691, 和光純薬工業) は、DNase, RNase-free 水に溶解し、実験により 10-50 µM の濃度にて投与した。リポポリサッカライド (LPS B55:O5)は、DNase, RNase-free 水に溶解し、100 ng/ml の濃度にて投与した。サブスタンス P は、DNase, RNase-free 水に溶解し、10 nM の濃度にて投与した。車前子由来成分オウクビン (016-10351, 和光純薬工業) は、生理食塩水に溶解し、100 µM の濃度にて投与した。

(qRT-PCR 法による炎症性サイトカイン産生評価)

炎症性サイトカインの測定は、qRT-PCR 法を用いて行った。U251 細胞にパクリタキセル、オキサリプラチン、LPS、サブスタンス P を投与し 24 時間培養した。セパゾール試薬(09379-55、ナカライテスク)を用いて細胞を回収し、RNA を抽出した。cDNA を合成したのち、qPCR 法により GFAP、IL-6、IL-1β、TNFα、MCP-1、GAPDH の mRNA 量を測定した。細胞へのアウクビン投与は、パクリタキセル投与の 30 分前に実施した。

(MTS 法による細胞障害活性測定)

細胞障害活性は MTS 法により評価した。アウクビンを 1-100 µM の濃度で MG6 細胞と U251MG 細胞に投与し、24 時間培養した。MTS 試薬を添加し 2 時間培養したのち、490nm の波長にて吸光度を

測定した。

【結果】

1) オキサリプラチンのアストロサイト炎症応答誘導：炎症性サイトカイン産生

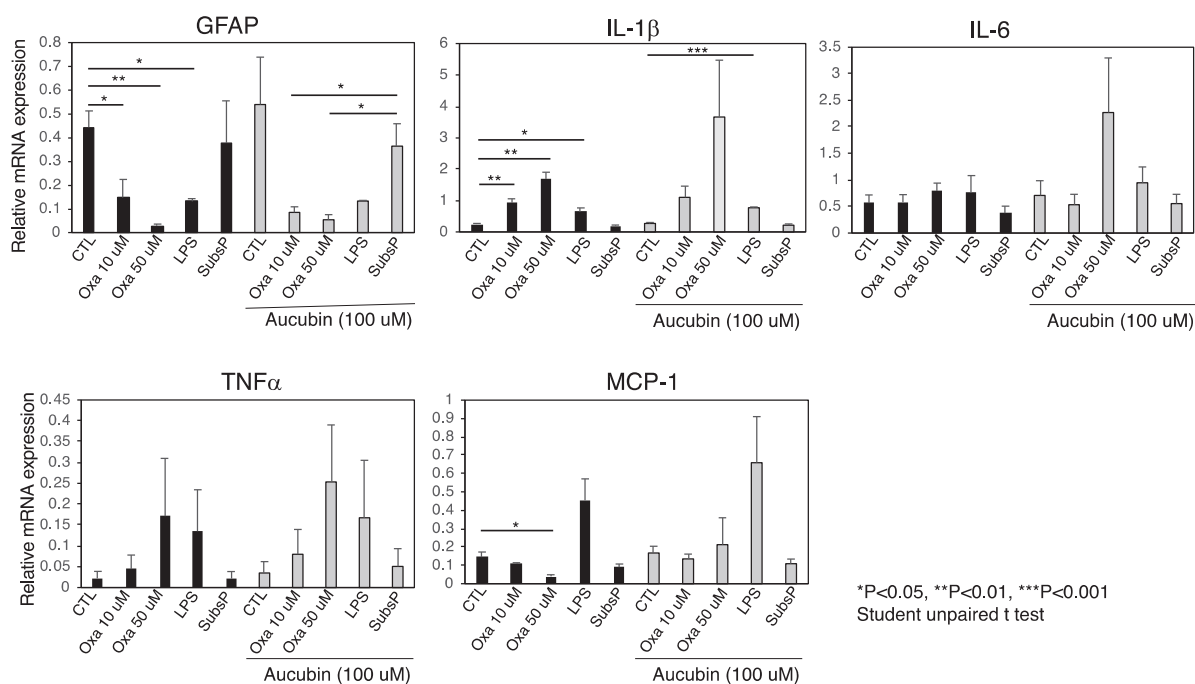
研究代表者の安東らは、オキサリプラチン誘導性の末梢神経障害モデルマウスにおいて、アウクビンはオキサリプラチンによるミクログリア活性化には影響せず、オキサリプラチンによるアストロサイトの活性化を特異的に抑えることを見出している。アウクビンの中枢におけるアストロサイト活性化抑制機構の解析を実施した。アストロサイトがどのような刺激に反応し、炎症応答を惹起するのかを明らかとするため、種々のリガンドによりアストロサイトを刺激し、炎症性サイトカインとアストロサイトの活性化マーカーの変動を指標として炎症応答の解析を行った。まず、末梢神経障害を誘導する抗がん剤のオキサリプラチンに対する応答性を検討した。アストロサイト細胞株 U251 細胞に、オキサリプラチンを 10, 50 μM の濃度で投与し、投与後 24 時間の GFAP と IL-1 β と IL-6 と TNF α と MCP-1 の mRNA 量を qPCR 法にて検討した。オキサリプラチンによる刺激は、炎症性サイトカインである IL-1 β の発現を濃度依存的に顕著に誘導し、IL-6 と TNF α の発現誘導は示さなかった。一方で、MCP-1 の発現は減弱した。次いで、グラム陽性菌の菌体成分である LPS に対する応答性を検証した。LPS による刺激は、オキサリプラチン刺激と同様に、IL-1 β の誘導を促した一方で IL-6 は変動せず、TNF α と MCP-1 については、上昇する傾向を認めたものの統計的有意差は示さなかった。神経ペプチドであるサブスタンス P による刺激は IL-1 β と IL-6 と TNF α と MCP-1 のいずれのサイトカインについても mRNA の上昇を誘導しなかった。興味深いことに、オキサリプラチンまたは LPS の刺激により IL-1 β の発現が上昇するのと相反するように、活性化マーカーである GFAP の発現が低下した (図 1)。

以上より、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトに作用し、IL-1 β の産生を介して炎症応答の惹起しうることが示唆された。

2) アストロサイト U251 細胞の炎症応答誘導に対するアウクビンの効果

次いで、アウクビンのアストロサイトの炎症応答に対する抑制効果について検証を行った。アストロサイト U251 細胞にアウクビン 100 μM を投与し、30 分後にオキサリプラチンにて刺激し、24 時間後の炎症性サイトカインの mRNA レベルを測定した。その結果、アウクビンはオキサリプラチン投与によって誘導される炎症性サイトカイン IL-1 β の mRNA 発現に対して顕著な抑制効果を示さなかった (図 1)。更に、アウクビンは、LPS 誘導性の IL-1 β mRNA 産生に対しても有意な抑制効果を示さないことが分かった。前項の検討の結果、サブスタンス P による刺激はアストロサイトに有意な変化を示さなかったが、アウクビン存在下でも同様に変化を認めなかった。以上

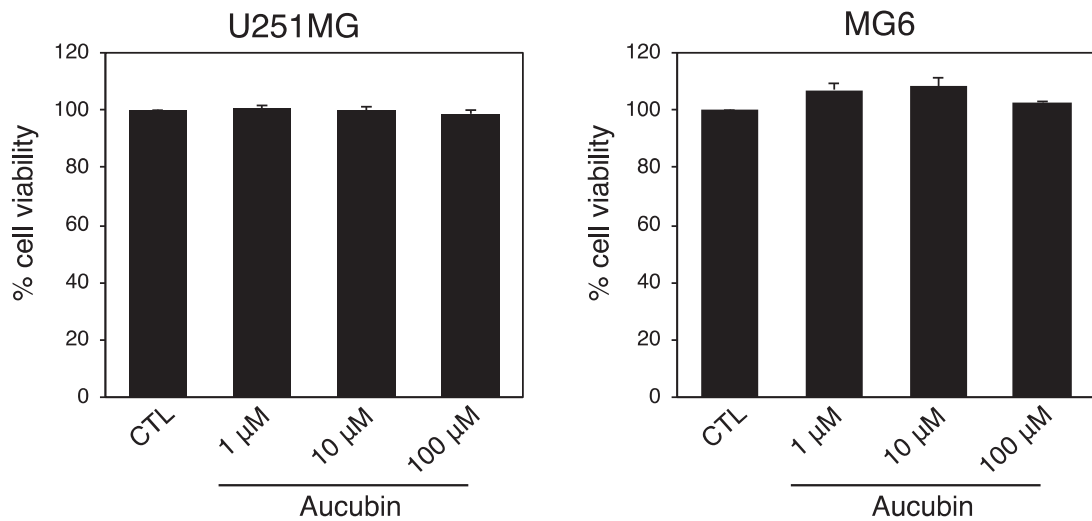
の結果は、アウクピンはオキサリプラチンまたは LPS による応答に直接的な抑制効果は有していないことを示唆する。



(図 1. 種々の刺激によるアストロサイトの炎症性サイトカイン産生誘導とアウクピンの効果。オキサリプラチンまたは LPS の投与により炎症性サイトカインである IL-1β の転写が誘導された。アウクピンはオキサリプラチンまたは LPS 誘導性のサイトカイン産生の抑制効果を示さなかった。)

3) アウクピンのミクログリア MG6 細胞とアストロサイト U251 細胞への細胞障害活性の検証

マウスモデルを用いた検証から、アウクピンはオキサリプラチンによって誘発される末梢神経障害およびアストロサイトの活性化を抑制する。このアウクピンの効果は、中枢においてはアストロサイトに対して細胞障害活性を示すことによるか否かについて検証を行った。アウクピンを 1, 10, 100 μM の濃度でアストロサイト U251 細胞に投与し、24 時間培養後の細胞生存率を MTS 試薬にて評価した。その結果、アウクピン投与は MG6 細胞と U251 細胞の生存率を下げることは認められなかった (図 2)。アストロサイトはミクログリアから放出される物質によっても活性化されることから、アウクピンのミクログリア MG6 細胞に対する細胞障害活性を検証した。その結果、アウクピン処理は、MG6 細胞の細胞生存に影響を与えなかった。以上より、検討した濃度域において、アウクピンは MG6 細胞、U251 細胞に対して細胞毒性を示さないことが分かった。



(図 2. アウクビンのミクログリア MG6 細胞とアストロサイト U251 の細胞生存に与える影響。アウクビン 1-100 uM 投与は、細胞生存率を低下させる効果を示さなかった。)

【考察と今後の展望】

ヒトアストロサイトマ由来細胞株 U251 細胞を用いた解析により、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトに作用し炎症性サイトカインである IL-1β の転写を誘導することが示された。一方で、代表的な炎症性サイトカインである IL-6 や TNFα の転写の誘導を認めなかった。IL-1β は前駆体として産生され、細胞内タンパク質分解酵素により切断されることにより活性型となり、細胞外へ放出され、機能を発揮することを考慮すると、オキサリプラチンにより活性型 IL-1β の産生と放出も誘導されうるかは今後検討すべき課題である。一方で、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトの活性化マーカーである GFAP の発現を抑制することを見出した。これは、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトを負に制御する能力を有しているのか、または、IL-1β の誘導に伴って生じた現象なのか、の可能性が存在することから注意深く見極める必要があるが、本検討により、オキサリプラチンと LPS はアストロサイトの機能の制御に関わることを示唆しうるものと考えられる。菌体由来成分である LPS はその受容体である TLR4 を介して、脳内マクロファージであるミクログリアの炎症応答を誘導し種々の中枢性病態と関わっていることが示唆されていることから、LPS は中枢においてミクログリアのみならずアストロサイトにも作用し、中枢疾患病態と関わっている可能性を示している。

アウクビンは、オキサリプラチンまたは LPS による IL-1β の転写の抑制効果を示さなかった。すなわち、アウクビンは、オキサリプラチンのアストロサイトの作用を直接的に抑制するのではなく、別の経路を介してアストロサイトの活性化を抑制することが考えられる。

中枢において、アストロサイトは様々な刺激により活性化する。神経ペプチドであるサブスタンス

P は、一次求心性ニューロンに含まれ、刺激に応じて神経週末のシナプス小胞から放出され、神経伝達物質として機能する。そこで、本検討では、サブスタンス P によるアストロサイトの活性化とその活性化機構へのアウクビンの関与の可能性を考え、検証を行った。本モデルにおいて、サブスタンス P はアストロサイト U251 細胞に対しては炎症性サイトカインの産生誘導能を示さないとの知見が得られた。

アウクビンが直接的にアストロサイトの生存に影響を与えての活性状態の制御が、アウクビンによるアストロサイト活性化の抑制機構として含まれるか否かについての検証を進めた。その結果、アウクビンは検討に用いた濃度域においては、アストロサイトの細胞生存および増殖に影響を及ぼすことは認められなかった。加えて、アウクビンはミクログリア MG6 細胞に対しても同様の効果を示した。すなわち、アウクビンは細胞障害活性とは別の機構によって、アストロサイトの活性を制御していることが考えられる。

本検討により、中枢系においてオキサリプラチンと LPS はアストロサイトの活性を変化させうることが分かった。アストロサイトが活性化に伴い放出する様々なメディエーターは、脊髄後角神経細胞などのニューロンへ作用することを考えると、アストロサイトの活性化を制御する成分は、疼痛制御を担う有望な候補分子へとつながることが期待される。

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部(医学) 分子医科薬理学講座

Sailesh Palikhe

II. 急速経口免疫療法と葛根湯の併用による食物アレルギー疾患に対する根本的治療法の創出

—東西医薬学の融合によるトランスレーショナルリサーチ—

富山大学・和漢医薬学総合研究所・消化管生理学分野	教授	門脇	真
(同)	助教	山本	武
富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）	小児科学	教授	足立 雄一
(同)	助教	伊藤	靖典

【研究背景，目的，概要】

わが国における食物アレルギー有症率は、乳児が約 10%、3 歳児が約 5%、保育所児が 5.1%、学童以降が 1.3~4.5%とされている。全年齢を通して、わが国では推定 1~2%程度の有症率であると考えられており、近年さらに増加傾向にあると報告されている（日本医療研究開発機構 (AMED) 研究班 食物アレルギーの診療の手引き 2017）。現在食物アレルギーの治療法は、食物アレルゲン（原因抗原）を除去する除去食療法及び発症した症状を抑制する薬剤による対症療法に限られており、原因食物に対する耐性を獲得するような根本的な治療法は確立されていない。また除去食療法には、原因抗原となる食品には卵や牛乳、小麦等といった高栄養の食品が多いことから特に小児では栄養面での偏りによる成長・発達への影響や、加工食品や外食など原材料の把握が難しい場合における誤食による死亡事故の発生等の多くの問題が報告されている。従って、耐性獲得（根本的治癒）に至る治療法や治療薬の開発が強く望まれている。

現在、一部の専門医施設では、食物アレルギー患者に対し免疫寛容を誘導し耐性獲得（根本的治癒）の可能性のある新規治療法として原因抗原の経口摂取による経口免疫療法 (OIT) が行なわれており、一部の患者での耐性獲得（根本的治癒）も報告されている。OIT の定義は、「自然経過では早期に耐性獲得が期待できない症例に対して、事前の食物経口負荷試験で症状誘発閾値を確認した後に原因食物を医師の指導のもとで経口摂取させ、閾値上昇または脱感作状態とした上で、究極的には耐性獲得を目指す治療法」とされている（日本小児アレルギー学会の「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」）。

本研究グループの研究者が所属する本学付属病院小児科でも、食物アレルギー児に対して、倫理委員会の承認を得て、2010 年より OIT を実施している（臨認 22-138 「重症食物アレルギー児に対する

原因食物を用いた急速経口免疫療法の有用性に関する研究)。

しかし、OIT の治療上の問題点は、

- 一部の症例には治療効果はあるがエビデンスレベルは低い。
- 経過中の症状誘発は必発である。
- 予期せずアナフィラキシーを引き起こすことがある。
- OIT 終了後に、治療対象食物の摂取により症状が誘発される場合がある。

とされ、我が国での問題点は、

- 倫理委員会での承認を受けずに研究的診療として実施している施設がある。
- 治療経過中の安全対策の不備が見受けられる。
- 発症閾値が不明の症例に対し、自宅での摂取量の増量を安易に指導する。

とされている（日本小児アレルギー学会の「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」）。

また、OIT の治療機序に関しては不明な点が多く、これまでに動物モデルで OIT の治療効果を示す報告も殆どない。従って、OIT は未だ研究段階の治療法であり、日本小児アレルギー学会の「食物アレルギー診療ガイドライン 2016」及び日本医療研究開発機構（AMED）研究班「食物アレルギーの診療の手引き 2017」では、OIT を食物アレルギーの一般診療として推奨していないため、OIT は現時点では一般診療として厚生労働省に認可されていない。しかし、OIT は、現状では食物アレルギーに対する唯一の耐性獲得（根本的治癒）に至る可能性がある治療法として期待されているため、多くの様々な基礎研究及び臨床研究が試みられているが、未だ十分な安全かつ治療効果が期待できる OIT の開発は報告されていない。

OIT は、主に制御性 T 細胞を誘導して免疫寛容を導くことにより、食物アレルギー疾患を根本的に治癒させる可能性が最も高いと考えられているが、有効性及び安全性の面で未だ多くの未解決の問題が残されている。従って、現在の OIT に改良を加えて十分に制御性 T 細胞を安全に誘導することができれば、OIT を研究段階の治療法から一般的治療法へ発展させることが出来ると考えられる。しかし、現在まで制御性 T 細胞を確実に誘導することが出来る薬剤は報告されていない。これまでに本研究グループは、漢方薬・葛根湯が、主に腸管において制御性 T 細胞を誘導することにより、食物アレルギー病態モデルで有効性を示すことを報告している (Int Arch Allergy Immunol. 169:146-156. 2016)。従って、OIT に葛根湯の投与を併用することにより、食物アレルギーに対する安全性及び有効性が高い根本的治療法の開発が可能であると考えている。

そこで本研究では、基礎研究から臨床研究へのトランスレーショナルリサーチにより、東西医薬学を融合した安全かつ効果的な食物アレルギー疾患の根本的治療法の確立を目指している。すなわち本

研究では、OIT の主な治療機序であると推定されている制御性 T 細胞の誘導作用等により食物アレルギー病態モデルで有効性を示した葛根湯を、免疫寛容を誘導し耐性獲得（根本的治癒）に至る可能性がある OIT に併用することにより、安全性及び有効性の高い OIT を確立すると共にその治療機序の詳細を明らかにすることを目的としている。そのために、基礎研究として抗原摂取によりアレルギー症状を呈する食物アレルギー病態モデルマウスに対して OIT を行い、さらに葛根湯を併用することによる治療効果の亢進とその治療機序を検討する。さらに、臨床研究として食物アレルギー患者に対して急速 OIT を施行し、葛根湯併用の有無による治療効果及び安全性をランダム化比較試験にて評価する。

「OIT と制御性 T 細胞誘導剤の併用療法」、「OIT と免疫寛容を誘導する漢方薬の併用療法」というアレルギー疾患に対する治療コンセプトは今まで報告されておらず、本研究はアレルギー治療における対症療法から根本的治療法へのパラダイムシフトを実現するための有用な治療法を提示する独創的な研究となると考えられる。すなわち、本研究は食物アレルギーの安全かつ効果的な根本的治療法の確立に繋がると考えられる。

和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野の研究グループ（門脇真、山本武）は、研究課題「病態モデルを用いた OIT と葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明」を遂行した。これまでに、OIT と葛根湯の併用療法が腸管に制御性 T 細胞をより多く誘導し、OIT の治療効果を亢進させることを明らかにしている（PLoS One. 12, e0170577, 2017）。

そこで、OIT と葛根湯の併用療法の腸管の粘膜型マスト細胞に対する効果を検討したところ、粘膜型マスト細胞の活性化は優位に抑制されていた。

OIT と葛根湯の併用療法は OIT の治療効果を有意に亢進させたが、その効果は充分ではない。治療効果を上げるためには制御性 T 細胞をさらに持続的に誘導する必要があるが、OIT を長期間続けることは副作用を誘発する可能性が高くなる。そこで、OIT と葛根湯の併用療法後に、葛根湯のみの長期投与による治療効果の検討を行ったが、有意な治療効果の亢進は認められなかった。

また、OIT の問題点の 1 つである低い脱感作維持率さらには耐性獲得率の改善を目指して、OIT および OIT と葛根湯の併用療法による脱感作状態が維持されるかどうか検討した。その結果、OIT と葛根湯の併用療法群では、3 週間後にも治療効果が維持され、未治療群および OIT 単独群と比較して発症率は有為に低かった。従って、OIT への葛根湯の併用は治療効果を上げるだけでなく、脱感作維持、さらには耐性獲得の誘導効果もある可能性が示唆された。

また、医学部小児科学講座の研究グループ（足立雄一、伊藤靖典）は、和漢医薬学総合研究所消化管生理学分野の研究グループの基礎研究結果を基に、「食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法に

おける葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討（臨 28-100）」を開始した。具体的な方法としては、重症の食物アレルギー児に対して、入院した上で、誘発される原因食物を摂取させることで徐々に症状が出にくくなる状態（減感作状態）を誘導し、その後自宅でその量を維持し耐性獲得（根本的治癒）させるという治療であった。しかしながら、2017年11月の神奈川こども医療センターでのOIT中の児のアナフィラキシーショックによる低酸素脳症の発症という重篤な有害事象により、危険性や社会的世論の影響を配慮した計画の変更が必要となった。そこで、より安全性の高い臨床研究に変更し、負荷試験の閾値、誘発された症状の重症度から、摂取しても症状が誘発されない安全な量を設定し、摂取させることとした。そして、臨床試験対象者を、葛根湯の無作為化を行い、6ヶ月間安全な量での摂取を継続しながら、葛根湯を併用するグループと併用しないグループの2群間で、6ヶ月後の食物負荷試験での摂取できる閾値の変化を主要評価項目とする臨床試験に変更し、富山大学倫理委員会にて承認を受け、臨床試験を開始した（臨 29-77 食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性獲得誘導効果の検討 —ランダム化比較試験—）。

2019年1月24日時点で、6ヶ月の臨床研究が終了したのは葛根湯内服群7名、非内服群9名であり、脱落者はなく、自宅での誘発症状 Grade3（重度）の有害事象は認めなかった。また、臨床的な有害事象や、総蛋白や肝機能などの一般生化学検査の明らかな異常は一人も見られなかった。食物経口負荷試験による閾値評価では、閾値上昇したのは葛根湯内服群で7名中6名、非内服群で9名6名であった。血中の特異的 IgE 抗体価は、症例が少なく、統計解析ができないが、葛根湯内服群では IgE 抗体が低下している症例が多く、今後も症例を蓄積し解析する予定である。本研究は、葛根湯の保険適用外治療に該当するため、特定臨床研究に該当すると判断されたため、現在、特定臨床研究の手続きを開始している。今後も症例を蓄積し、目標症例60名（葛根湯30名、対照30名程度）を目標に臨床研究を継続する予定である。

以上により、世界に先駆けて作製した OIT モデルを用いた基礎研究とそのトランスレーショナルリサーチである臨床研究を行うことにより、経験的な治療法の探索ではなく、科学的根拠が明らかで、安全性と有効性を兼ね備えた新規根本的治療法を創出することが可能であると考えられる。このように、西洋医薬学（OIT）と東洋医薬学（葛根湯）のそれぞれの利点を生かして問題点を補完的に解決することにより、食物アレルギー疾患を安全かつ効果的に根治に導くことが出来ると考える。また、OIT と免疫寛容を誘導する漢方薬の併用療法の治療機序を明らかにすることにより、他のアレルギー疾患や自己免疫疾患の治療に対しても、漢方薬のドラッグ・リポジショニングによる新たな治療戦略、創薬戦略を提示できると考える。

このような東西医薬学が融合した新規根本的治療法を開発し発信していくことは、薬の富山・和漢薬の富山としての特徴をさらに発展させることが出来ると考える。

Ⅱ-1 病態モデルを用いた経口免疫療法と 葛根湯の併用療法の科学的根拠の解明

富山大学・和漢医薬学総合研究所 消化管生理学分野 教授 門 脇 真
(同) 助教 山 本 武

【研究の背景と目的】

食物アレルギーは原因食物を摂取した後に免疫学的機序を介して蕁麻疹や下痢などの生体にとって不利益な症状が惹起される現象であり、現在、日本を含め先進国では小児を中心に増加傾向にある。しかし、未だ根本的な治療法が存在しておらず、原因食物を除去する除去食療法のような消極的な治療法が行われており、摂取食物の制限による栄養不足や誤食に対する不安などが患者の QOL の低下に繋がっている。また、不慮の原因食物摂取による重篤な症状の発症や死亡事故も報告されている。従って、食物アレルギーの根本的治癒に繋がる積極的な治療法の開発が望まれている。

経口免疫療法 (OIT) は原因食物を少量から投与し続けることによって、原因食物による症状発症の閾値の上昇や原因食物に対する脱感作状態を誘導し、最終的に耐性獲得 (寛解維持) に導く、食物アレルギーを根本的に治癒する治療法であると考えられている。実際に、OIT を実施した患者の一部に耐性が獲得されたことが報告されている。しかし、原因食物投与により治療を行うため、重篤な副作用を発症する可能性があることや必ずしも高くない治療成績、原因食物による耐性獲得効率の差、治療機序が十分に解明されていないこと等により、未だ研究段階の治療法とされている。

そこで我々は、OIT による治療効果の向上や副作用の軽減などを目的とした新たな治療法を検討するために、原因食物の摂取によりアレルギー症状を発症する食物アレルギーモデルマウスに対して、臨床と同様に加熱した原因食物抗原を摂取させて OIT を行う実験的 OIT モデルを作製した。この実験的 OIT モデルを用いて、腸管に制御性 T 細胞を誘導することを明らかにした葛根湯 (Int Arch Allergy Immunol.148:175-85.2009. ; Int Arch Allergy Immunol.169:146-56. 2016) を併用する治療法を検討し、OIT と葛根湯の併用療法が腸管に制御性 T 細胞を増加させて、OIT の治療効率 (脱感作誘導率) を上げることを明らかにしている (PLoS One. 12, e0170577, 2017. ; 平成 29 年度「和漢薬・バイオテクノロジー委託研究」報告書)。

そこで本研究では、この併用療法が食物アレルギーの脱感作誘導率を上げるのみではなく、耐性獲得に繋がるかどうか検討するとともに、耐性獲得誘導率を上げる検討を行った。

【方法】

動物実験

BALB/c マウスを使用し、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に基づき、動物実験委員会の承認のもと動物倫理に配慮して動物実験を行った。

食物アレルギー病態モデルの作製と経口免疫療法および葛根湯併用療法

昨年度と同様に、5週齢のBALB/c マウスを鶏卵白アルブミン (OVA) /水酸化アルミニウムで全身感作し、その2週間後から粗精製 OVA 粉末を1日おきに経口投与し消化器症状を発症する食物アレルギー (FA) マウスを作製した。この FA マウスに対して、実験的 OIT として加熱処理した OVA を1日1回、0.5 mg、1 mg、2 mg、4 mg、8 mg、12 mg、18 mg、20 mg (/日) と段階的に漸増させて投与した。OIT への葛根湯の併用は OVA 投与の1時間前に葛根湯 (500 mg/kg) を投与した。各治療後に食物抗原の経口負荷試験として粗精製 OVA を経口投与し、1時間後にアレルギー症状の発症を糞便の状態で評価した。また、耐性獲得の検討として、各治療後に OVA 除去期間を設け、1週間ごとに OVA 経口負荷試験による症状の評価を行った。さらに、耐性獲得を誘導するために治療後に葛根湯 (500 mg/kg) のみを2日に1回投与した。FA 病態モデルおよび治療モデルの詳細を図1に示す。

粘膜固有層細胞の単離および解析

摘出した結腸を EDTA 処置し粘膜上皮細胞層を除去した後、酵素処理により単離細胞を分取した。さらに、Percoll (Sigma) を用いた密度勾配法により細胞精製を行い、結腸の粘膜固有層細胞 (LP 細胞) を得た。

得られた LP 細胞を PE 標識抗マウス ckit 抗体 (BioLegend)、FITC 標識抗マウス IgE 抗体 (BD Biosciences) および APC 標識抗マウス CD63 抗体 (BioLegend) を用いて染色し、フローサイトメーターFACS CantoII (BD Biosciences) を用いて測定および解析を行った。また、単離 LP 細胞を Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて固定と透過処理を行い、PE 標識抗マウス CD4 抗体 (clone RM4-5; BD Biosciences) と APC 標識抗マウス/ラット Foxp3 抗体 (clone FJK-16s; eBioscience) により染色し、フローサイトメーターFACS CantoIIを使用して、制御性 T 細胞の割合を測定した。

免疫組織化学的染色

摘出した近位結腸を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し凍結包埋した。クリオスタット (Leica) により 30 μ m の薄切切片を作製し、ヒツジ抗マウス mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) 抗体 (Moredun Scientific) と Alexa488 標識ロバ抗ヒツジ IgG 抗体 (Jackson Immuno-research Laboratories) を順次反応させた。蛍光画像は蛍光顕微鏡 (キーエンス BZ-8000) を用いて取得し、蛍光画像を ImageJ で数値化

した。

統計学的解析

データは平均値±標準誤差で示した。統計学的有意差は Mann-Whitney 検定または Bonferroni/Dunn 型多重比較検定で行い、相関の有意差の検定には Pearson の相関係数の検定を用い、P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

【結果と考察】

消化器症状を発症する食物アレルギー病態モデルマウスを作製し、食物抗原として OVA の投与によりアレルギー性消化器症状を発症するマウスに対して、OVA の漸増投与による実験的 OIT を行った (図 1)。

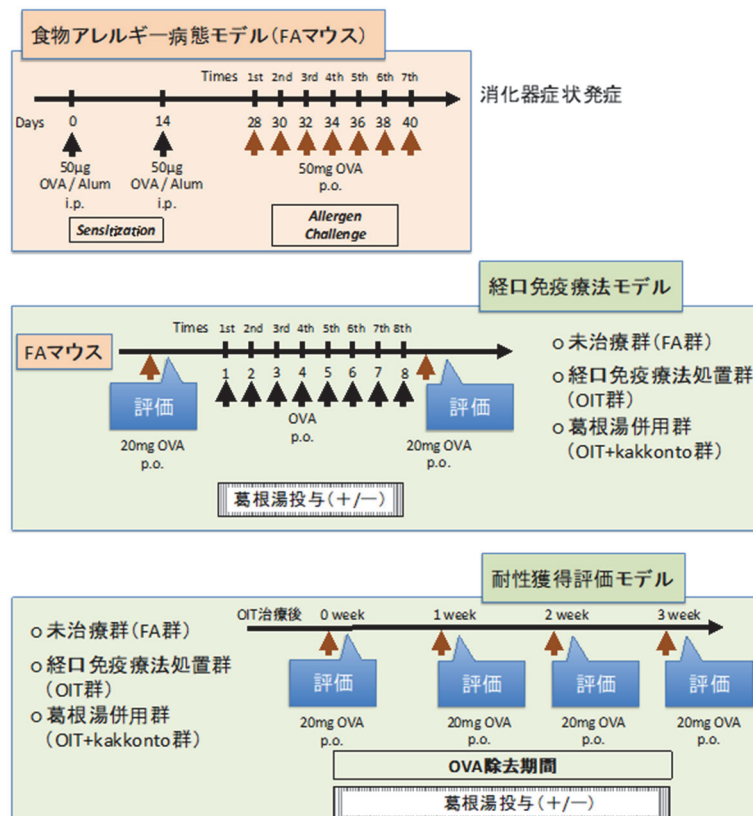


図 1. モデル作製

FA モデル、OIT モデルおよび耐性評価モデルの作製のプロトコルを示す。

葛根湯併用 OIT による粘膜型マスト細胞の活性化への影響を検討するために、葛根湯併用 OIT 後に消化器症状評価を行い、LP 細胞の $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現について解析した。 $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞の CD63 発現をフローサイトメトリーにより解析した典型例を示す (図 2

(a)。LP 細胞の $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現を示す平均蛍光強度は、OIT に葛根湯を併用した群 (OIT+kakkonto 群) で未治療群 (FA 群) に対して有意に低かった (図 2 (b))。また、CD63 発現を示す平均蛍光強度は、マウスの消化器症状と正に相関する傾向を示した ($P = 0.15$; 図 2 (c))。

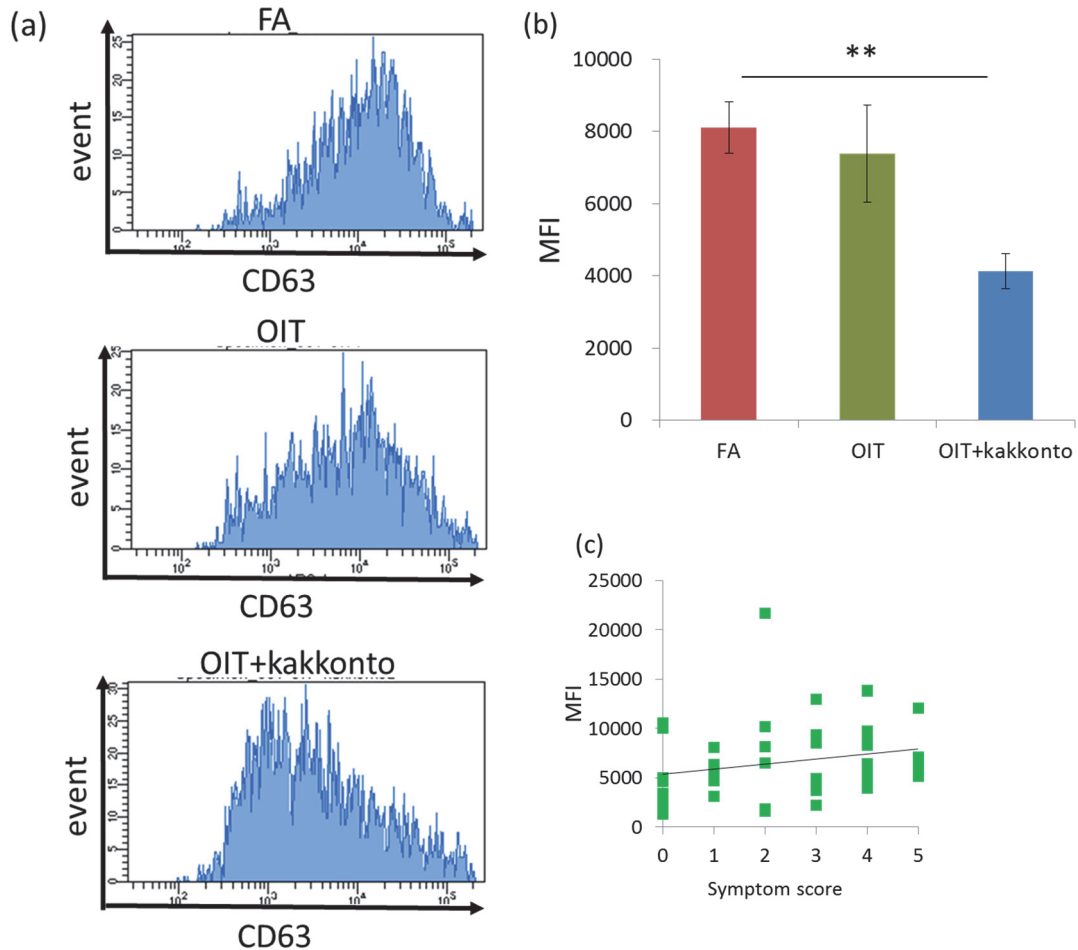


図 2. 各治療後の LP 細胞における $Fc\epsilon RI^{+}c-kit^{+}$ 粘膜型マスト細胞の CD63 発現

FA マウスおよび OIT マウス、葛根湯併用 OIT マウスの LP 細胞において、 $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現を測定した。フローサイトメトリーによる CD63 発現解析の蛍光強度の典型例を示す (a)。 $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞における CD63 の発現を平均蛍光強度で示した (b)。LP 細胞の $Fc\epsilon RI^{+}ckit^{+}$ 粘膜型マスト細胞における CD63 発現は、FA 群に対して OIT+kakkonto 群で有意に低かった。(FA n=19, OIT n=14, OIT+kakkonto n=14, $**P < 0.01$) CD63 発現の測定に使用した 3 群のマウスの消化器症状を 6 段階で評価し、0 を Normal, 1 を Soft stool, 2 を Loose stool, 3 を Middle diarrhea, 4 を Severe diarrhea, 5 を Fluid stool とした。消化器症状と CD63 発現の平均蛍光強度の相関を示す (c)。CD63 の蛍光強度は、マウスの消化器症状と正に相関する傾向を示した。(P = 0.15 ; n=45)

脱感作維持、耐性獲得を検討した結果を図 3 に示す。FA 群では、OVA 投与により 93.3% のマウスが症状を発症した。OIT 群では 66.7% のマウスが症状を発症し、FA 群と比較して症状発症率が低下し、食物アレルギーに対する治療効果が認められた。OIT+kakkonto 群では症状発症率は 26.7% にまで低下し FA 群および OIT 群と比較して有意であり、OIT 群と比較して高い治療効果 (脱感作誘導率) を示

した。この OIT および OIT と葛根湯の併用療法による脱感作状態が維持されるかどうか、3 週間の OVA 除去期間を設け 1 週間ごとに OVA 投与を行い治療効果の維持を評価した。治療後 1 週間および 2 週間では OIT による治療効果は維持されたが、3 週間目にはすべてのマウスが再び症状を発症した。一方、OIT+kakkonto 群では、3 週間後にも治療効果が維持され、FA 群および OIT 群と比較して発症率は有為に低かった。従って、OIT への葛根湯の併用は、脱感作効誘導率を上げるだけでなく、脱感作維持、さらには耐性獲得の誘導効果もある可能性が示唆された。

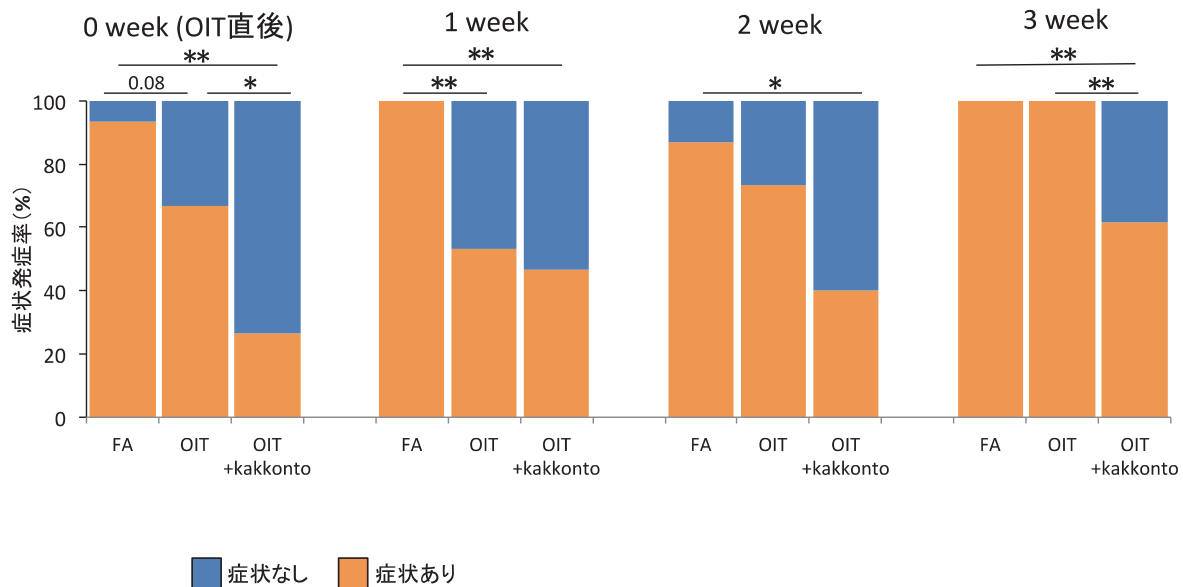


図3. FA に対する脱感作維持の検討

OIT または葛根湯との併用療法を行った後 OVA 除去期間を設け、各除去期間の FA の発症率を示す。n = 13-15, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

これまでに OIT のひとつの治療機序として、免疫系を抑制的に制御する制御性 T 細胞の増加が報告されている (J Allergy Clin Immunol. 124: 292-300. 2009)。我々も、これまでに葛根湯と OIT との併用療法が結腸の粘膜固有層に制御性 T 細胞を増加させ、食物アレルギーの発症を抑制することを報告している (PLoS One. 12, e0170577, 2017.;平成 29 年度「和漢薬・バイオテクノロジー委託研究」報告書)。そこで、OIT と葛根湯併用による耐性獲得の誘導効果に制御性 T 細胞が関与するか検討するために、治療 3 週間後に結腸の LP 細胞における制御性 T 細胞の割合を測定した。OIT と葛根湯の併用療法で結腸 CD4⁺T 細胞中の制御性 T 細胞 (CD4⁺Foxp3⁺細胞) の割合が OIT 治療直後には有意に高かったにもかかわらず (PLoS One. 12, e0170577, 2017.;平成 29 年度「和漢薬・バイオテクノロジー委託研究」報告書)、3 週間後には FA 群、OIT 群、OIT+kakkonto 群で有意な差はなかった (図 4)。

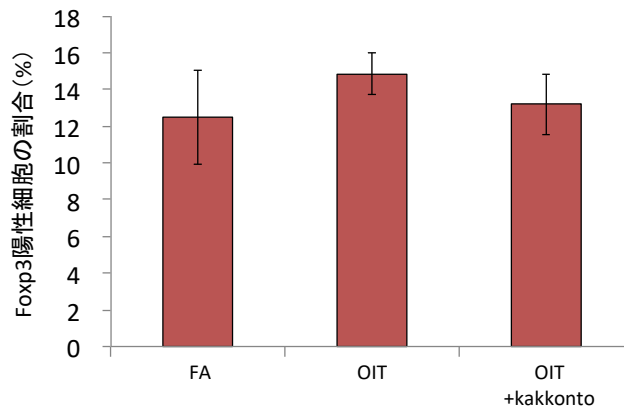


図4. LP細胞における制御性T細胞の割合
フローサイトメトリーによる腸管粘膜層CD4⁺T細胞中の制御性T細胞(CD4⁺Foxp3⁺細胞)の割合の解析結果を示す。n=8

また、食物アレルギーのエフェクター細胞である粘膜型マスト細胞は、FA群と比較しOIT群とOIT+kakkonto群で結腸に増多が確認され、OITでの抗原投与による副作用と推測された(PLoS One. 12, e0170577, 2017.;平成29年度「和漢薬・バイオテクノロジー委託研究」報告書)。しかし、3週間後にはOIT+kakkonto群の結腸の粘膜型マスト細胞の分布数はOIT群と比較して有意に減少しFA群と同程度であった(図5)。さらに、血漿中mMCP1量もOIT+kakkonto群でOIT群やFA群と比較し有意に減少した。

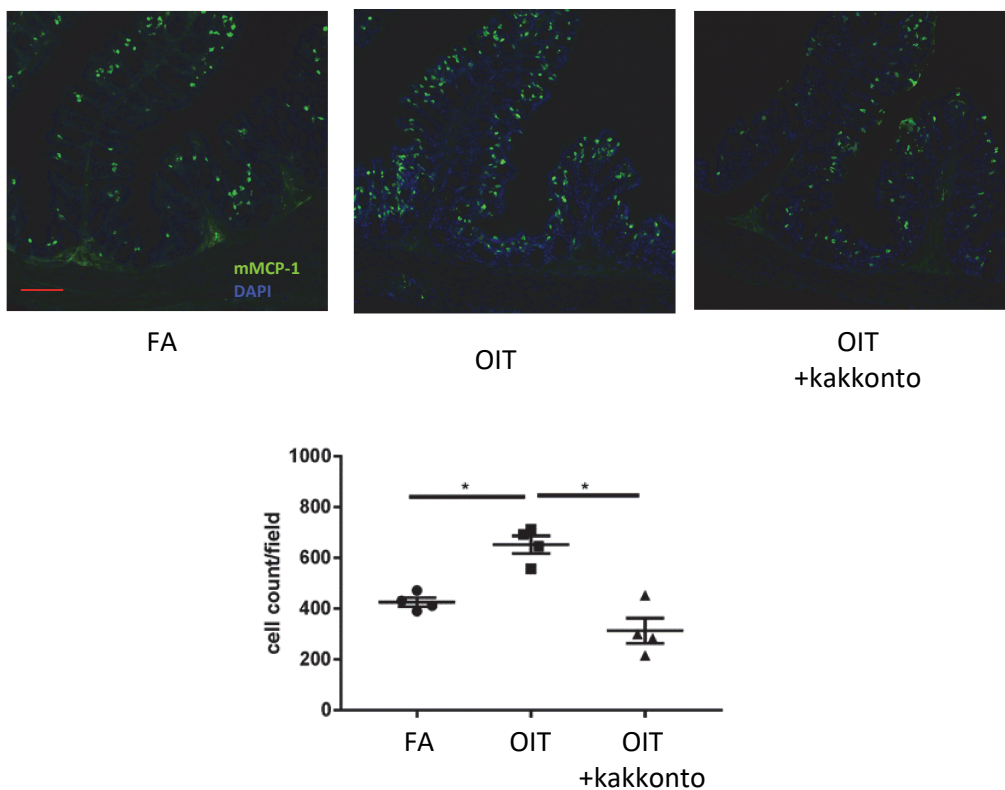


図5. 結腸における粘膜型マスト細胞の分布
粘膜型マスト細胞を抗mMCP-1抗体で染色した典型例とmMCP-1陽性細胞を計測した結果を示す。n=4、*P<0.05、緑:mMCP-1、青:核(DAPI)、スケールバー:100μm

従って、OIT と葛根湯併用療法が、結腸の制御性 T 細胞の誘導や粘膜型マスト細胞の浸潤抑制や脱顆粒の抑制を含めた腸管粘膜免疫系を改善し、脱感作状態の誘導や耐性獲得に繋がる可能性があることが示唆された。

OIT と葛根湯の併用療法は OIT の治療効率を有意に亢進させたが、その効果は充分ではない。治療効果を上げるためには制御性 T 細胞をさらに持続的に誘導する必要があるが、OIT を長期間続けることは副作用を誘発する可能性が高くなる。そこで、さらに治療効果を上げるために葛根湯の併用療法後に、葛根湯の長期投与による治療効率の変化を検討した。しかし、3 週間後の OVA 負荷試験による症状発症率は、葛根湯長期投与の有無によらず差は認められなかった (図 6)。

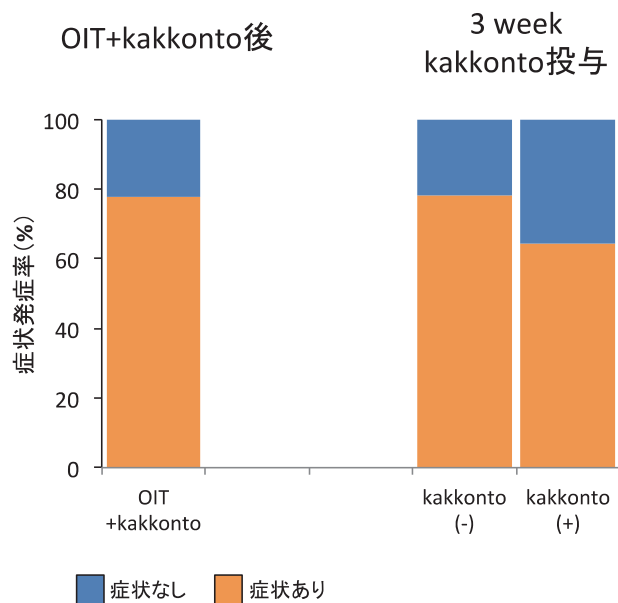


図 6. OIT と葛根湯の併用療法後の脱感作維持のための葛根湯持続投与の効果
OIT と葛根湯の併用療法後の OVA 除去期間に、葛根湯の投与の有無による FA の発症率を示す。
3 week 葛根湯投与 n = 31、3 week 葛根湯未投与 n = 23

【まとめ】

葛根湯の併用は OIT の治療効果を亢進し脱感作誘導率を上げ、食物アレルギーの治療に有効であった。また、その治療効果は OIT 単独治療よりも維持され耐性獲得を誘導する可能性がある。

Ⅱ-2 食物アレルギー児に対する急速経口免疫療法における 葛根湯併用のランダム化比較試験による効果の検討

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 小児科学 教授 足立 雄一
（同） 助教 伊藤 靖典

【研究の背景と目的】

近年、食物アレルギーに罹患する子どもたちの数が増加傾向にある。食物アレルギー診療ガイドライン 2016 では、食物アレルギーの管理・治療としては、必要最小限度の除去を行い、自然な耐性獲得（寛解）を待つのが主たる方針である。近年では、食物負荷試験が普及し、負荷試験の結果を踏まえた食事指導をおこなうことで、耐性獲得誘導を目指しているが、摂取可能（耐性獲得）となる児もいる中で、耐性獲得できない児も存在する。また、安全な量での摂取を指導しても時にアレルギー症状を生じることもあり、必要最低限の食事摂取の有効性・安全性については未解決な問題が多く存在している。

経口的免疫寛容を適正に誘導することができれば、将来の耐性獲得を期待できる。漢方薬は複数の治療標的に作用することによって、生体の三大調節機構（神経系、免疫系、内分泌系）の病的なバランスの偏りを改善することを目的にしている方剤が多く、アレルギー疾患のような多因子性疾患の治療に対する多成分系である漢方薬の基礎的及び臨床的有効性が示されている。葛根湯は、感冒症状で使用される代表的な漢方薬であるが、共同研究者の和漢医薬学総合研究所の山本、門脇らにより、マウス食物アレルギー病態モデルにおける葛根湯の食物アレルギーの発症抑制効果が報告され、食物アレルギー患者に対して、耐性獲得誘導を促す補助的治療手段となりえる可能性が示され、本研究ではヒトの食物アレルギー児に対して葛根湯を併用することで耐性獲得誘導への効果・安全性をランダム化比較試験にて評価することを目的とした。

本研究の意義

葛根湯の併用による重症食物アレルギー患者への食事指導を施行することの安全性、有効性が立証されれば、これまで食物アレルギーで自然耐性化の見込めないような患者に対しても、積極的な食事指導を検討することができ、患者の QOL の向上が期待できると考える。

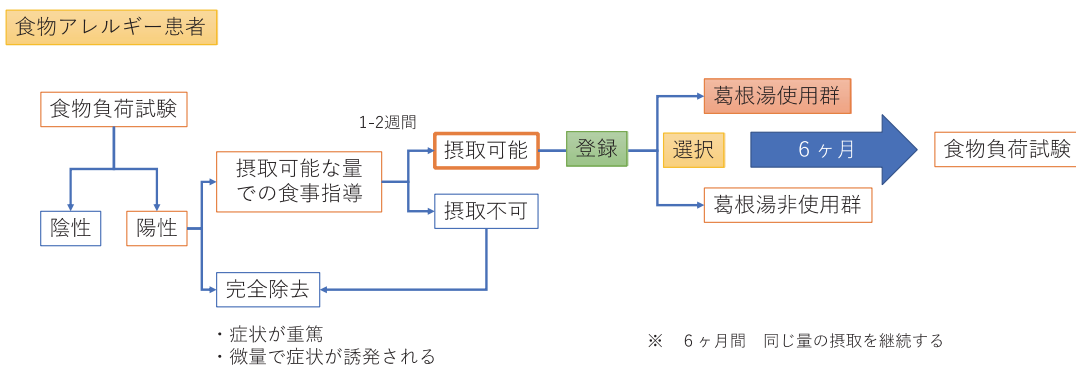
【現在の進捗状況】

① 臨床試験の開始

2017年11月27日富山大学倫理委員会にて承認を受け、臨床試験を開始した。（臨 29-77 食物アレルギー児の食事指導における葛根湯併用の耐性獲得誘導効果の検討 —ランダム化比較試験—）

- ・臨床研究を開始したが、葛根湯が飲めない児も多く、ランダム化ができない状況となり、臨床研究の遂行が困難となったため、2018年6月に研究計画を一部変更し、葛根湯を内服できる児とできない児に振り替わる非ランダム化比較試験に変更した。

研究の流れ



② 2018年1月現在の進捗状況

登録症例数： 21名（うち、6ヶ月後評価終了 16名）

登録平均年齢は6.8歳（男児11名、女児10名）であり、原因食品は鶏卵11名、牛乳6名、コムギ3名であった。

登録症例背景

葛根湯内服群・非内服群において、年齢・男女比・合併症・総IgE・末梢血好酸球数に群間有意差は認められなかった。

登録総数 n=21		内服群 n = 11	非内服群 n=10
年齢(歳) 中央値(min-max)		6(5-10)	7.5(5-9)
男/女		6 / 5	5 / 5
原因食品	鶏卵	5	6
	牛乳	3	3
	小麦	2	1
合併症	気管支喘息	2	1
	アトピー性皮膚炎	3	2
検査	総IgE(平均±SD) IU/ml	1690±751	1678±1415
	好酸球数(平均±SD) / μ l	682±428	485±335

※各群で有意差なし

登録前食物経口負荷試験結果

群間登録前の食物経口負荷試験において原因食品の誘発閾値タンパク量・誘発症状重症度、負荷試験に基づく摂取指導量においても群間有意差はみられなかった。

	内服群 n = 11	非内服群 n=10	
登録時閾値 (タンパク量:mg) 中央値(min-max)	22 (3.3 - 1320)	66 (44 - 342)	p=0.171
誘発症状Grade	Grade1: 5 Grade2: 6	Grade1: 4 Grade2: 6	
摂取維持量(タンパク量:mg) 中央値(min-max)	6.6 (1.1 - 308)	14.3 (2.2 - 190)	p=0.432

6ヶ月後評価終了児の経過

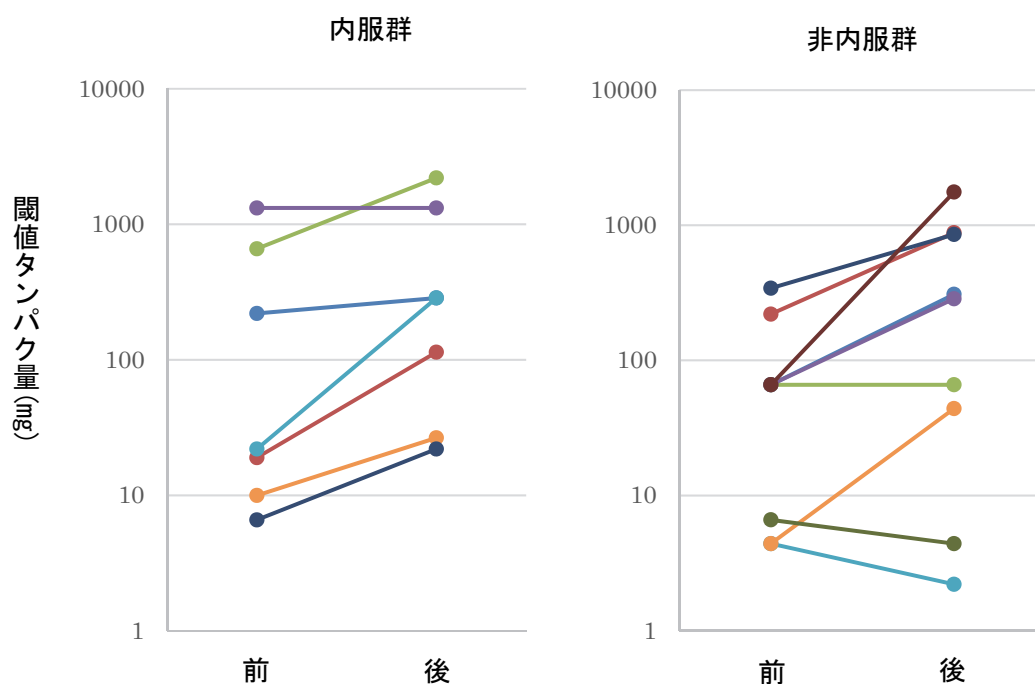
2019年1月24日時点で、6ヶ月の臨床研究が終了したのは葛根湯内服群7名、非内服群9名であり、脱落者はなく、自宅での誘発症状 Grade3（重度）の有害事象は認めなかった。また、臨床的な有害事象や、総蛋白や肝機能などの一般生化学検査の明らかな異常は一人も見られなかった。

1週間あたりの原因食品の平均摂取回数

葛根湯内服群は中央値 6.25/週（2.25-7）、非内服群は 5/週（0.75-7）であり、群間有意差は認められなかった（ $p=0.117$ ）

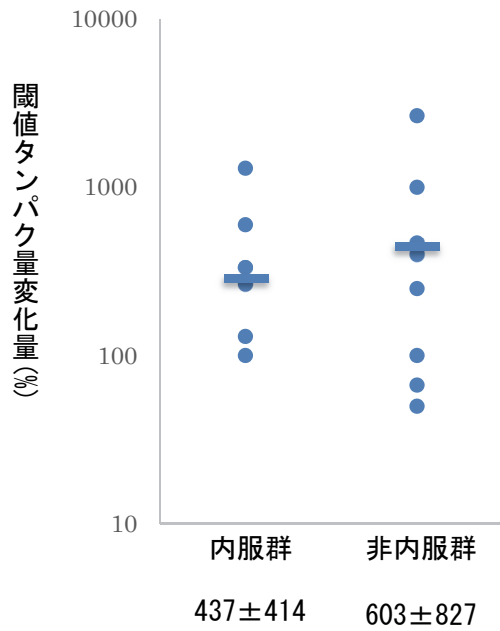
閾値の変化

食物経口負荷試験による閾値評価では、葛根湯内服群（ $n=7$ ）では平均閾値タンパク量が登録時 $322\pm 499\text{mg}$ が、 $607\pm 834\text{mg}$ に有意に上昇し（ $p=0.01$ 、wilcoxon 検定）、非内服群においても平均閾値タンパク量は $93\pm 114\text{mg}$ から、 $467\pm 593\text{mg}$ に有意に上昇していた（ $p=0.01$ ）。



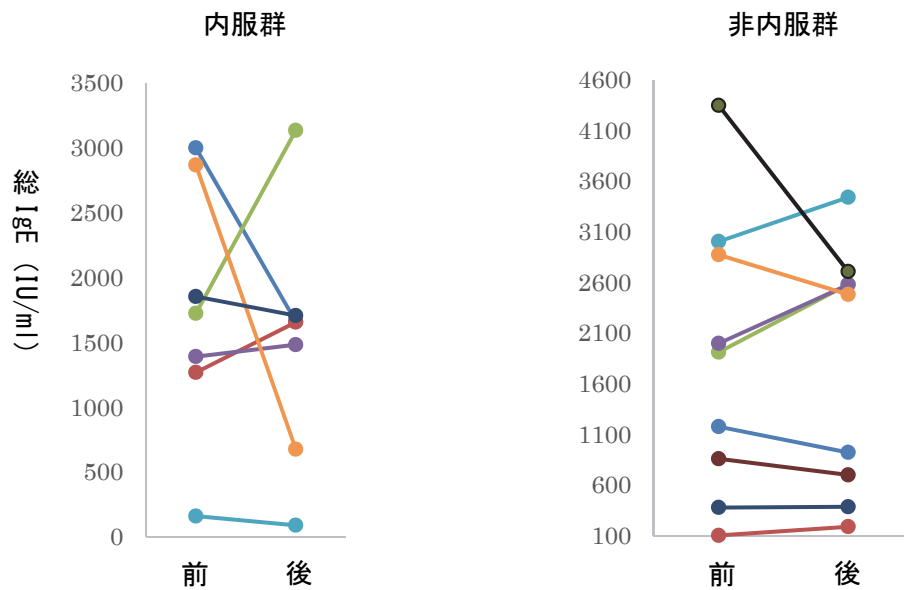
閾値上昇したのは葛根湯内服群6名、非内服群6名、閾値の上昇がなかったのは内服群1名、非内服群3名であり有意差は見られなかった（ χ^2 検定： $p=0.38$ ）。

閾値変化量（6ヶ月後／登録時*100%）は、葛根湯内服群は 437 ± 414 （%）であり、非内服群は 603 ± 827 （%）であった。統計学的な群間有意差は見られなかった（ $p=0.31$ ）。



総 IgE 抗体価および特異的 IgE 抗体価の変化

総 IgE 抗体価



総 IgE については 葛根湯内服群は上昇 3 名、低下 4 名、非内服群で上昇 5 名、低下 4 名であり有意差は見られなかった。

特異的 IgE 抗体価

N が少ないため、表にて全症例表示する(単位: IU/ml)。

内服群

牛乳

牛乳		前	6ヶ月後
P2	牛乳	100	100
	カゼイン	100	95.4
	β ラクトグロブリン	0.51	0.21
P5	牛乳	18.3	11.4
	カゼイン	26.7	17.2
	β ラクトグロブリン	0.27	0.36

非内服群

牛乳		前	6ヶ月後
C2	牛乳	64	54.6
	カゼイン	44	36.9
	β ラクトグロブリン	32.7	27.3
C5	牛乳	9.15	4.33
	カゼイン	0.82	0.49
	β ラクトグロブリン	4.03	1.6

鶏卵

鶏卵		前	6ヶ月後
P8	卵白	24.3	16.7
	オホムコイト	15.1	11.5
P12	卵白	12.7	5.75
	オホムコイト	8.56	3.37
P17	卵白	100	100
	オホムコイト	100	100

鶏卵		前	6ヶ月後
C1	卵白	49.5	27.7
	オホムコイト	20.3	10.1
C6	卵白	1.71	2.86
	オホムコイト	1.72	3.47
C9	卵白	28.8	19.2
	オホムコイト	23.7	15.7
C11	卵白	41.8	41.2
	オホムコイト	34	28.8
C13	卵白	62.3	47.9
	オホムコイト	30.8	27.3
C16	卵白	100	100
	オホムコイト	100	97.2

小麦

小麦		前	6ヶ月後
P4	コムギ	30.8	28.1
	グルテン	45.9	25
	ω 5G	3.68	1.63
P15	コムギ	100	100
	グルテン	100	100
	ω 5G	8.18	2.82

小麦		前	6ヶ月後
C14	コムギ	4.39	4.89
	グルテン	5.31	5.58
	ω 5G	0.13	0.1

まだ症例が少なく、統計解析ができないが、内服群では IgE 抗体価が低下している症例が多く（ただし、>100 の場合には評価困難）、今後も症例を蓄積し解析する予定である。

③ 今後の予定

本研究は、葛根湯の保険適用外治療に該当するため、特定臨床研究に該当すると判断されたため、現在、特定臨床研究の手続きを開始している。

今後も症例を蓄積し、目標症例 60 名（葛根湯 30 名、対照 30 名程度）を目標に臨床研究を継続する予定である。