

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

神経障害性疼痛は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬では、コントロールが難しく、新規鎮痛薬の探索が求められている。神経障害性疼痛の中でも、抗がん薬の副作用の一つである末梢神経障害性疼痛は、近年、問題となっている疼痛である。抗がん薬による末梢神経障害性疼痛の発生は、抗がん薬の休薬の一つの指標ともなっており、抗がん薬治療を受けている患者にとって負の要因となっている。したがって、そのコントロールは非常に重要である。

これまでに、マウスにおいて抗がん薬パクリタキセル誘発の末梢神経障害性疼痛に漢方方剤の牛車腎気丸が有用であることを見出した。更に、その構成生薬の中でも車前子成分が重要であること、既知の成分であるアウクビンが疼痛抑制に寄与していることを明らかにしてきた。

そこで、本年の研究では、アウクビンがパクリタキセル以外の他の抗がん薬誘発の末梢神経障害性疼痛を抑制するか、また、車前子成分でアウクビン以外の有効成分があるのか、さらに、アウクビンの疼痛抑制作用機序解明を行うべく、疼痛発生に寄与しているミクログリアへのアウクビンの作用を検討した。

【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、ビンクリスチン、ボルテゾミブを投与すると、疼痛様反応である機械的アロディニアが生じた。そこで、アウクビンをこれら抗がん薬投与翌日から1日1回経口投与すると、オキサリプラチン及びビンクリスチン誘発の機械的アロディニアを有意に抑制した。その抑制効果は、オキサリプラチン投与マウスによって生じた機械的アロディニアに対しての方が強か

った。一方、アウクビンは、ボルテゾミブ誘発の機械的アロディニアを抑制しなかった。オキサリプラチン誘発機械的アロディニアの発生にはマスト細胞が関与することをこれまで報告してきた。しかし、アウクビンは、オキサリプラチン誘発のマスト細胞の増加には影響しなかった。以上の結果から、アウクビンの抗アロディニア作用にマスト細胞への作用以外の作用が関与することが示唆される。

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）

車前子の熱水抽出物にメタノールを加えて多糖類を沈殿，除去し，その上清をカラムに付して，水-メタノール溶媒でメタノール含量を20%ずつ増加させながら順次溶出した。マウスモデルを用いて抗アロディニア作用を評価したところ，20%メタノール画分で活性が認められた。更に分画を繰り返して，粗画分（crude 3, crude 4）を得た。Crude 3画分は，30 mg/kg および 100 mg/kg の経口投与で有意な抗アロディニア作用を示したが，crude 4画分には作用が認められなかった。Crude 3画分から化合物を単離し，各種機器分析を行い，pedicularis-lactone を同定した。以上，pedicularis-lactone は，車前子の経口投与による抗アロディニア作用発現に重要な役割を果たす可能性を見出した。

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)

ミクログリアは脊髄において疼痛発生に寄与していることが最近の研究で明らかとなっている。そこで，ミクログリアへのパクリタキセルの作用を検討した。マウスミクログリア細胞株 MG6 へのパクリタキセル適用により，炎症性サイトカイン IL-6 並びに TNF- α の産生が増加した。さらに，神経変性をもたらすなど神経恒常性に影響する窒素酸化物の産生に関しては，パクリタキセルの適用により，その産生が増加することが見出された。そこで，これらパクリタキセル誘発の炎症性サイトカインや窒素酸化物の産生へのアウクビンの効果を検討した。しかしながら，アウクビンは，パクリタキセル誘発の炎症性サイトカインや窒素酸化物の産生には影響しなかった。したがって，他の機序の存在が示唆される。

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】

抗がん薬治療は、がん患者にとって非常に重要な薬物治療法の一つである。しかしながら、抗がん薬投与により、嘔吐や末梢神経障害など患者のQOL（生活の質）や闘病意欲に対して影響をあたえる副作用の発生が問題となっている。これまでに、嘔吐に関しては、セロトニン 5-HT₃ 受容体拮抗薬やニューロキニン 1 (NK1) 受容体の拮抗薬が臨床で使用され、嘔吐の軽減への有効性が認められている。その一方で、末梢神経障害に関しては、鎮痛薬や鎮痛補助薬は無効である場合が多く、そのコントロールは困難とされている。また、この末梢神経障害の発生は、抗がん薬の投薬中止の指標ともされている。さらに、抗がん薬中止後も1年以上、末梢神経障害が持続する場合もある。そこで、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。

これまでに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）が抗がん薬パクリタキセル誘発機械的アロディニアを抑制すること、牛車腎気丸の構成生薬の牛膝および車前子を除いた生薬で構成される八味地黄丸ではパクリタキセル誘発機械的アロディニアに対して抑制効果が認められなかったことを見出してきた。更に牛膝エキスではなく車前子エキスの投与によりパクリタキセル誘発機械的アロディニアが抑制されたことを明らかにしてきた。車前子の主要成分としてアウクビン、ゲニポシジン酸、カタルポールが知られているが、この中でアウクビンにおいてのみパクリタキセル誘発機械的アロディニアが抑制された。このことから、車前子成分のアウクビンが牛車腎気丸によるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの抑制作用に重要である可能性を見出した。そこで、本研究では、末梢神経障害を誘発する他の抗がん薬（オキサリプラチン、ピンクリスチン、ボルテゾミブ）へのアウクビンの効果を検討した。さらに、車前子中のアウクビン含有量は非常に少ないので、他の活性成分が抗アロディニア作用に寄与している可能性があるため、車前子成分の分画物を用い、パクリタキセル誘発機械的アロディニアへの効果を検討した。

【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。ビンクリスチン硫酸塩 (Sigma-Aldrich) は、生理食塩水に溶解し、0.1mg/kg の用量で単回腹腔内注射した。ボルテゾミブ (Toronto Research Chemicals, Ltd., Toronto, Canada) は、0.03%マンニトール含有生理食塩水に溶解し、0.3mg/kg の用量で単回尾静脈内注射した。パクリタキセル (Sigma-Aldrich) は、Cremophor EL, 100% エタノール及び生理食塩水を 1:1:8 の割合で調製した溶媒にて溶解し、5 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 (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。

(車前子分画物)

車前子分画物は、共同研究者である富山大学和漢医薬学総合研究所生薬資源科学 (小松, 當銘, 侯) により提供されたものを使用した。この分画物 (crude 3 及び crude 4) は、5%アラビアゴムに溶解し、抗がん薬投与翌日より 1 日 1 回経口投与した。

(行動評価①：機械的アロディニア)

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 段階のスコア化しアロディニアを評価した。

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)

(行動評価②：冷刺激による不快異常感覚)

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 段階のスコア化しアロディニアを評価した。

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)

(トルイジンブルー染色)

後肢皮膚の凍結切片を作製し、0.1%トルイジンブルーで染色を行った。

【結果】

(1) 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効果

オキサリプラチン投与により機械的アロディニアは、投与後 10 日目をピークとして憎悪した。この憎悪に対してアウクビンの連続投与は、有意に抑制した。また、オキサリプラチン投与患者では、冷たい刺激に対して過敏になることが知られている。マウスへのオキサリプラチン投与により、投与後 3 日目をピークとして冷刺激に対する過敏反応（不快異常感覚）が誘発された。しかし、アウクビンは、この冷刺激に対する不快異常感覚は抑制しなかった。

(2) ビンクリスチン誘発機械的アロディニアに対するアウクビンの効果

ビンクリスチン投与により機械的アロディニアは、投与後 14 日目をピークとして憎悪した。この憎悪に対してアウクビンの連続投与は、有意に抑制した。

(3) ボルテゾミブ誘発機械的アロディニアに対するアウクビンの効果

ボルテゾミブ投与により機械的アロディニアは、投与後 12 日目をピークとして憎悪した。この憎悪に対してアウクビンの連続投与は、抑制しなかった。

(4) オキサリプラチン投与マウス後肢皮膚でのマスト細胞へアウクビンの効果

オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアの発生に皮膚マスト細胞の増加と活性化が関与していることをこれまでに報告してきた。オキサリプラチン投与マウス皮膚において、溶媒投与コントロールマウスに比べ有意にマスト細胞数の増加が認められた。しかし、アウクビンの連続投与は、オキサリプラチン投与による皮膚マスト細胞の増加に対して抑制傾向は示したが有意ではなかった。

(5) パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対する車前子エキス画分 (crude 3 及び crude 4) の効果

パクリタキセル誘発機械的アロディニアに対して、車前子エキス画分連続投与を行った。Crude 3の連続投与により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアが有意に抑制された。一方、crude 4の連続投与では、抑制されなかった。

【考察と今後の展望】

本研究では、これまで評価した抗がん薬パクリタキセル以外の3つの抗がん薬(オキサリプラチン、ビンクリスチン、ボルテゾミブ)誘発の機械的アロディニアあるいは、一部冷刺激誘発不快異常感覚に対する車前子の活性成分の一つであるアウクビンの効果を検討した。アウクビンは、オキサリプラチン及びビンクリスチン誘発の機械的アロディニアを抑制したがボルテゾミブ誘発の機械的アロディニアは抑制しなかった。また、アウクビンのアロディニア憎悪抑制作用は、オキサリプラチン誘発の機械的アロディニアへの作用がビンクリスチンのそれより大きかった。したがって、アウクビンは、パクリタキセル、オキサリプラチン、ビンクリスチン誘発の末梢神経障害性疼痛に有用であることが示唆される。

オキサリプラチン誘発機械的アロディニアへのアウクビンによる抑制作用はビンクリスチン誘発機械的アロディニアに対する抑制作用より大きかった。この機械的アロディニアには、皮膚マスト細胞が関与することを見出している。しかし、アウクビンはマスト細胞の増加にほとんど影響しなかった。したがって、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抑制作用には、マスト細胞への影響以外の作用が関与することが示唆される。今後、アウクビンによる抗アロディニア効果の機序を解明していく予定である。

本研究では、オキサリプラチン投与患者の特徴である冷刺激に対する過敏反応に対してもアウクビンの効果を検討したが、抑制されなかった。オキサリプラチン投与による冷刺激誘発の過敏反応には、温度感受性イオンチャネル TRPM8 が関与することを見出している。おそらくアウクビンは、TRPM8の発現や活性化に影響しなかった可能性がある。

車前子エキスにおけるアウクビンの含有量は、実際には非常に少ない。そこで、アウクビン以外の活性成分があることが示唆される。本研究では、車前子エキス画分の crude 3 と crude 4 のパクリタキセル誘発機械的アロディニアへの抑制効果を検討したところ、crude 3 で抑制効果が認められた。今後、和漢医薬学総合研究所生物資源科学(小松, 當銘)と共同で、その活性成分の単離と評価をさらに行う予定である。

【学会発表】

- 1) 當銘一文, 加藤 充, 侯 志艶, 北村 亮, 葛 躍偉, 白 焱晶, 倉石 泰, 安東嗣修, 小松かつ子. 車前子由来パクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究. 第 34 回和

漢医薬学会学術集会; 2017 Aug 26-27; 福岡

- 2) 侯 志艶, 當銘一文, 安東嗣修, 小松かつ子. Search on anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen that suppress paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain. 日本生薬学会第 64 回年会; 2017 Sep 9-10; 千葉

【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】

がん化学療法はがん疾患における重要な治療法の1つであるが、その一方で、嘔吐や末梢神経障害（疼痛や痺れなど）などの副作用が問題となっている。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が著しく低下することに加え、抗がん薬の減薬や治療中止につながる場合も多い。また、抗がん薬治療の終了後においても、この末梢神経障害は継続することも多い。さらに既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬によるコントロールが非常に難しいことから、新たな予防・治療法が求められている。

10種の生薬から構成される漢方方剤である牛車腎気丸は、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る。近年、本方剤は抗がん薬による末梢神経障害に対しても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てきた。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、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。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ニアを抑制したが、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。この結果から、車前子中

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
山藥	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		
	+	-	-

+は抗アロディニア作用があることを示す。
数字は一日分の量を示す(g)

に抗アロディニア作用を有する成分が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い。

そこで、本研究では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、マウスモデルを用いて抗アロディニア作用を指標とした成分分画を進め、活性成分を含む画分の絞り込みを行った。また、活性画分からの成分探索を行い、4種の化合物の同定を行った。

【方法】

マウスモデルによる抗アロディニア作用の評価： 6週齢の雄性 C57BL/6 マウスの腹腔内にパクリタキセル (5 mg/kg) を単回投与することで機械的アロディニア (疼痛様行動) を誘発した。各投与群は1群あたり6匹のマウスを用いた。疼痛反応は、von Frey フィラメント (0.69 mN) を後肢足蹠皮膚に1~3秒間軽く押し当てた後、後肢の動きをスコア化することにより評価し、1日1回、13日連続して試料投与前に評価した。評価は左右の足それぞれについて3回ずつ行った。試料はパクリタキセルを投与した翌日より1日1回経口投与した。

成分探索： 車前子の熱水抽出物を水に溶解した後、水の1.5倍量のメタノールを添加することで60%メタノール水溶液とし、多糖類の沈殿を生じさせた。その後、遠心分離 (4,000 rpm, 15分) により得られた上清をダイヤイオン HP-21 カラムに付し、水-メタノール溶媒を用い、メタノールを20%ずつ段階的に増加させ溶出した。活性フラクションの分画は ODS-MPLC および、分取 HPLC を用いて行った。

ODS-MPLC では、Biotage MPLC システム (Isolera ACITM Spektra), Biotage SNAP Ultra C18 カラム (120 g, φ42×150 mm) を用い、水とメタノールの混合溶媒 (5 - 100%メタノール), 流速 50 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [5% MeOH (0 - 4.3 min), 5 - 15% MeOH (4.3 - 23.7 min), 30% MeOH (23.7 - 32.3 min), 100% MeOH (32.3 - 39.6 min)]。ピーク検出は200~400 nm の波長領域で行った。

分取 HPLC は、Waters の分取 HPLC システムを用いた (ポンプ Delta 600, UV 検出器 2489)。C30 カラムは Develosil C30-UG-5 (20×250 mm, 20×50 mm のガードカラム追加) を、溶媒 A として0.1%のギ酸水溶液を、溶媒 B としてアセトニトリルを用い、流速 10 mL/min の条件で分画を行った。溶媒のグラジエント条件は以下の通り [4% B (0 - 10 min), 4 - 30% B (10 - 32 min)]。ピーク検出は210 および257 nm の波長で行った。

単離成分の構造解析： 核磁気共鳴 (NMR) 装置は日本電子製 JEOL ECX-400 spectrometer または、JEOL ECA500II spectrometer を用い、重水素化溶媒 D₂O もしくは DMSO-d₆ を用いて測定した。ESI-MS は島津製 LCMS-IT-TOF 質量分析計にて測定した。旋光度は日本分光製 JASCO P2100 デジタル旋光度計を用いて

測定した。

【結果】

マウスモデルにおいて抗アロディニア作用が認められた車前子の成分探索を行うため、まず、車前子熱水抽出物を水に懸濁させ、メタノール処理することで多糖類を沈殿させた。得られた上清を減圧濃縮により溶媒留去し、粗抽出物（以下、メタノール処理車前子抽出物とする）を得た。

このメタノール処理車前子抽出物を水に懸濁させ、合成吸着樹脂であるダイヤイオン HP-21 カラムに付し、水-メタノール溶媒を用い、メタノールを 20% ずつ段階的に増加させ溶出した。得られた各溶出画分について抗アロディニア作用を評価した。その結果、20%メタノール溶出画分 (0.3 g/kg) に抗アロディニア作用が認められたが、他の溶出画分には作用は認められなかった。なお、マウスを用いた抗アロディニア作用の評価を行うには、1 回あたり 300 mg 程度の試料量が必要となる。分画を進めるに従い、得られる画分はおのずと少なくなるため、分画を進めるにあたっては、必要量を確保するため、適宜、車前子からの抽出を行った後に、分画操作を繰り返し行った。

次に抗アロディニア作用の認められた 20%メタノール溶出画分を、ODS-MPLC にて分画し 7 画分 (1A ~ 1G) を得た。これらの画分について作用を評価した結果、5-12%メタノールで溶出した画分 1C (0.15 g/kg) にのみ抗アロディニア作用が認められ、他の 6 画分には認められなかった。この画分 1C をさらに分取 C30-HPLC にて分画したところ、16 のピークが検出でき、これらを分取した。すべてのピークについて重水溶媒中で $^1\text{H-NMR}$ を測定したところ、4 つのピークは純度が高かったため、構造解析を行った。

これらの 4 つのピーク (P1~P4) の保持時間はそれぞれ 12.0 min, 16.5 min, 20.0 min, 24.5 min であった。

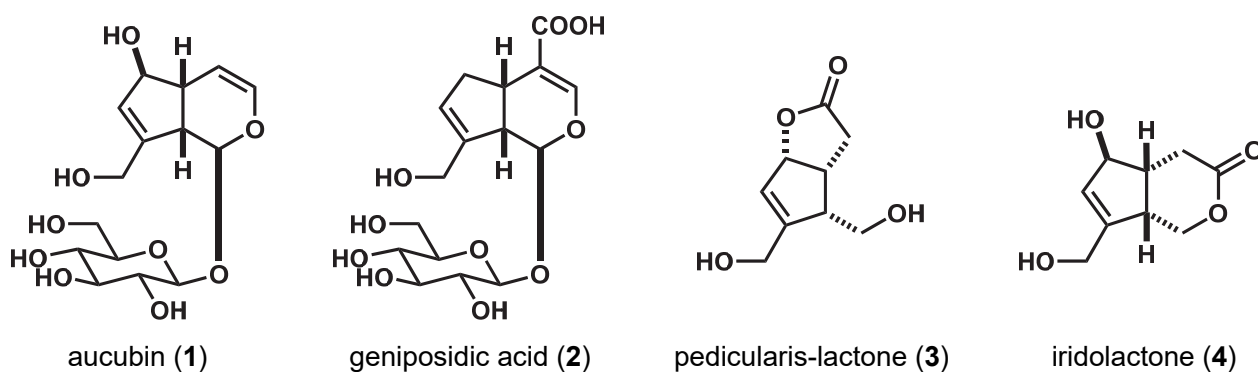
ESI-LC/MS においてピーク P3 は, m/z 369.1140 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 391.1258 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ の擬似分子イオンを、ピーク P4 は m/z 373.1145 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 747.2364 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ の擬似分子イオンを与えた。それぞれの $^1\text{H-NMR}$ データを、文献値と比較した結果、P3, P4 は、それぞれイリドイド配糖体である aucubin (1)⁵, geniposidic acid (2)⁶ であると同定した。これらの化合物は車前子の代表的な成分である。

化合物 1, 2 の抗アロディニア作用を検討したところ、経口投与では両者は抗アロディニア作用を示さなかった。

ピーク P2 は ESI-LC/MS において m/z 185.0797 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 207.0604 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ を示したことから分子式を $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ と推定した。 ^1H -および ^{13}C -NMR は pedicularis-lactone⁷ のものと良い一致を示した。旋光度は、 $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +33.4$ (c 0.19, MeOH) であり、pedicularis-lactone の旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{15} +45.5$ (c 0.15, MeOH)⁷ と良い一致を示した。以上より、ピーク P2 を pedicularis-lactone (3) と同定した。

ピーク P1 は ESI-LC/MS において m/z 185.0812 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 207.0629 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ を示したことから分子式を $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$ と推定した。 ^1H -および ^{13}C -NMR は iridolactone⁷ のものと良い一致を示した。旋光度は、 $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -12.8$ (c 0.14, MeOH) であり、iridolactone の旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{27} -15.3$ (c 0.3, MeOH)⁸ と良い一致を示した。以

上より、ピーク P1 を iridolactone (4) と同定した。化合物 3 および 4 はイリドイド化合物で、シオガマギク属植物 *Pedicularis chinensis* (ハマウツボ科 Orobanchaceae) の根⁷ およびゴマノハグサ *Scrophularia buergeriana* (ゴマノハグサ科 Scrophulariaceae) の根⁹、生薬「蔓荊子」の基原植物であるハマゴウ *Vitex rotundifolia* (クマツヅラ科 Verbenaceae) の果実¹⁰ などからの単離の報告があり、エナンチオ制御かつジアステレオ制御による有機合成も達成されている⁸。さらに 2017 年に車前子からも報告された¹¹。



精製した 3, 4 は 10 mg 程度と少量であったため、これを用いて抗アロディニア作用を検討することは難しかったが、それぞれを精製する前の粗画分 (crude 3, crude 4) については、多く分離できていたため、これを用いて抗アロディニア作用を評価することとした。これら粗画分の ¹H-NMR データの解析により 3, 4 がそれぞれ主要成分であることがわかったが、現在までのところ定量はできていない。今後、これら粗画分中の 3, 4 の含量について定量 NMR 法にて明らかにする予定である。

crude 3 画分は、30 mg/kg および 100 mg/kg の経口投与で有意に抗アロディニア作用を示したが、crude 4 画分には作用が認められなかった。したがって pedicularis-lactone (3) は、車前子の経口投与による抗アロディニア作用発現に重要な役割を果たすことが示唆された。

【考察】

車前子は、消炎、利尿作用を目的として、牛車腎気丸、五淋散、清心蓮子飲、竜胆瀉肝湯などの漢方処方構成生薬として用いられる。車前子が抗炎症作用を示すこと¹²は報告されていたが、鎮痛作用に関する報告はこれまでのところない。また、前述のように、車前子が配剤された牛車腎気丸は臨床で抗がん薬誘発末梢神経障害に対して用いられているが、これまで有効な生薬や、作用成分は明らかにされていない。したがって、車前子が抗がん薬により誘発される末梢神経障害性疼痛反応である機械的アロディニアを抑制することは、車前子の新しい作用として興味深く、その作用機構ならびに作用成分を解明することは、車前子を配剤した牛車腎気丸の効果のエビデンス構築の観点から重要である。現在のところ有効な予防および治療法がない抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛に対する新たな医療の提供に貢献できることが期待される。

本研究では、マウスにおけるパクリタキセル誘発アロディニアモデルにおいて有効であった車前子の熱水抽出物について、活性を指標とした分画を行い、活性画分より aucubin (1), geniposidic acid (2), pedicularis-lactone (3), iridolactone (4)を単離同定した。このうち、経口投与で抗アロディニア作用をもつと推定しているものは3であり、その他の化合物については抗アロディニア作用が認められなかった。安東らは aucubin (1, 50 mg/kg)の腹腔内連続投与により、抗アロディニア作用を示すこと³を報告しているが、今回の研究で経口投与による抗アロディニア作用は検討した結果、作用は認められなかった。腹腔内投与と経口投与とでは、投与後の体内動態が異なるため、経口投与による抗アロディニア作用は認められなかったと考えられるが、これについてはさらなる検討が必要であるとする。

また、活性画分より単離同定した pedicularis-lactone (3)であるが、本化合物を主に含む粗画分(crude 3画分)は30 mg/kg および 100 mg/kg の経口投与により有意に抗アロディニア作用を示した。¹H-NMRデータの解析により crude 3画分中に主要成分として3が含まれることはわかっているが、定量はできていない。今後、3の含量について定量 NMR 法にて明らかにする予定である。本化合物は車前子の経口投与による抗アロディニア作用の発現に重要な役割を果たすと考えられ、活性成分の一つであると示唆される。

活性成分には、1~4のほかにも様々な成分が存在することを確認しており、今後もさらなる活性成分の解明をめざし成分探索を進めていく。

前述のように安東らが行った実験においては、パクリタキセル誘発アロディニアモデルにおいては、附子を含む八味地黄丸は抗アロディニア作用を示さなかった¹³。牛車腎気丸はオキサリプラチン誘発機械的アロディニアに対する抑制効果も報告されているが、牧野らは加工附子に活性があったことを報告¹⁴している。実験に用いたアロディニアを誘発する抗がん薬の種類は異なっているが、牛車腎気丸の異なる構成生薬が抗アロディニア作用を示すことは興味深い。

【結論】

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、マウスモデルを用いて抗アロディニア作用を指標とした成分分画を進めた。その結果、車前子の熱水抽出物を分離して得られた抗アロディニア作用をもつ画分から、イリドイド配糖体である aucubin (1)と geniposidic acid (2), イリドイド化合物である pedicularis-lactone (3)と iridolactone (4)を単離同定した。このうち pedicularis-lactone (3)を主に含む画分 (crude 3) が抗アロディニア作用を示したことから、活性成分の一つであると示唆される。本化合物の抗アロディニア作用はこれまでに報告がない。今後有機合成にて本化合物の量的な供給が可能となり、詳細な抗アロディニア作用の作用機序が明らかになれば、車前子の抗アロディニア作用に新たなエビデンスを提供することにつながる。また、新たな医薬品開発へ貢献できるものとする。

【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, (1), 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, (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, (3), 305-308.
4. Ministry of Health, Labour and Welfare, *The Japanese Pharmacopeia, 17th edn.* 2016, 1517.
5. Davini, E.; Iavarone, C.; Trogolo, C.; Aureli, P.; Pasolini, B., The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycon of aucubin. *Phytochemistry* **1986**, 25, (10), 2420-2.
6. Toda, S.; Miyase, T.; Arichi, H.; Tanizawa, H.; Takino, Y., Natural antioxidants. II. Antioxidative components isolated from seeds of *Plantago asiatica* Linne. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, (3), 1270-3.
7. Li, Y.; Changzeng, W.; Zhongjian, J., Iridoids in roots of *Pedicularis chinensis*. *Phytochemistry* **1995**, 40, (2), 491-494.
8. Tanaka, H.; Kamikubo, T.; Yoshida, N.; Sakagami, H.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K., Enantio- and Diastereocontrolled Synthesis of (-)-Iridolactone and (+)-*Pedicularis*-lactone. *Org. Lett.* **2001**, 3, (5), 679-681.
9. 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, (11), 2789-2793.
10. 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, (6), 1094-1096.
11. Peng, Q. H.; Han, Z. Z.; Tong, R. C.; Hu, X. Q.; Yang, Q. M.; Qi, M.; Shi, Y. H.; Wang, Z. T.; Yang, L., [Chemical constituents from hypoglycemic active part of *Plantaginis Semen*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2017**, 42, (21), 4150-4153.
12. Tezuka, Y.; Irikawa, S.; Kaneko, T.; Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Xiong, Q.; Hase, K.; Kadota, S., Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 77, (2), 209-217.

13. Andoh, T.; Kitamura, R.; Kuraishi, Y.; Fushimi, H.; Komatsu, K.; Shibahara, N., Effects of goshajinkigan, hachimijogan, and rokumigan on mechanical allodynia induced by Paclitaxel in mice. *J Tradit Complement Med* **2014**, 4, (4), 293-297.
14. Suzuki, T.; Miyamoto, K.; Yokoyama, N.; Sugi, M.; Kagioka, A.; Kitao, Y.; Adachi, T.; Ohsawa, M.; Mizukami, H.; Makino, T., Processed aconite root and its active ingredient neoline may alleviate oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain. *Journal of Ethnopharmacology* **2016**, 186, 44-52.

【研究協力者】

富山大学 和漢医薬学総合研究所 生薬資源科学分野 侯 志艶

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。今年度は、パクリタキセルのミクログリアへの作用について解析を行った。

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ピンを同定している。本研究にて、中枢でのパクリタキセルの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ピンの効果を明らかとすることを目的として、ミクログリア炎症応答へのアウクピンの抑制効果について検証した。

【方法】

（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)

パクリタキセル (169-18611、和光純薬工業) は、ジメチルスルホキシドに溶解し、実験により 1-15 µM 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、500 µM の濃度にて投与した。

(ELISA 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、ELISA 法を用いて行った。MG6 細胞にパクリタキセルを投与し、24 時間培養した。培養上清を採取し、培養液中の IL-6 と TNFα 量を R&D 社の ELISA 試薬 (IL-6; DY406-05, TNFα; DY410-05)により測定した。細胞へのオウクビン投与は、パクリタキセル投与の 30 分前に実施した。

(Griess 法による窒素酸化物測定)

窒素酸化物は Griess 法により定量した。パクリタキセルを MG6 細胞に投与し、24 時間培養した。培養上清を採取し、スピнкаラムを用いた除タンパク処理の後、培養液中の NO₂ と NO₃ の量を NO₂/NO₃ Assay Kit-C (NK05, 同仁化学研究所)を用いて測定した。細胞へのオウクビン投与は、パクリタキセル投与の 30 分前に実施した。

【結果】

1) パクリタキセルのミクログリア炎症応答誘導：炎症性サイトカイン産生

パクリタキセルのミクログリアへの炎症誘導能について、炎症性サイトカインである IL-6 と TNFα の産生量を指標としてマウス脳ミクログリア細胞株、MG6 細胞を用いて検討を行った。パクリタキセルを 1, 5, 15 µM の濃度で投与し、投与後 24 時間の培養液中の IL-6 と TNFα 量を ELISA 法にて検討した結果、パクリタキセルの投与により濃度依存的に IL-6 と TNFα の産生が顕著に誘導された。

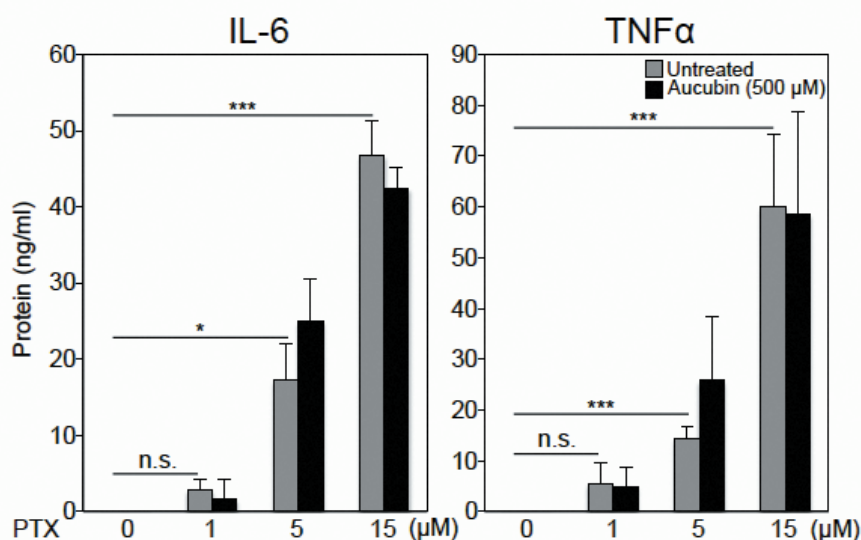
パクリタキセルのミクログリア炎症応答誘導：窒素酸化物産生

活性化ミクログリアから放出された大量の窒素酸化物は、神経変性をもたらすなど神経恒常性に影響する。そこで、パクリタキセルの MG6 細胞に対する窒素酸化物産生誘導活性について評価し

た。15 μM のパクリタキセルを投与後、24 時間に培養液中に放出された窒素酸化物 (NO_2 と NO_3) 量を Griess 法にて測定した結果、パクリタキセル投与により培地中の窒素酸化物は増加することが分かった。以上、1), 2)よりパクリタキセルは中枢においてミクログリアに作用し炎症性サイトカインと窒素酸化物の産生を促し、炎症応答を誘導しうることが示唆された。

2) パクリタキセルの MG6 細胞の炎症応答誘導に対するアウクビンの効果

アウクビンのパクリタキセル誘導性のミクログリアの炎症応答に対する抑制効果について検証を行った。ミクログリア MG6 細胞にアウクビン 500 μM を投与し、30 分後にパクリタキセルにて刺激し、24 時間後の炎症性サイトカインと窒素酸化物を測定した。その結果、アウクビンはパクリタキセルによる炎症性サイトカイン IL-6 と $\text{TNF}\alpha$ の産生誘導に対して顕著な抑制効果を示さなかった (図 1)。更に、窒素酸化物産生に対してもアウクビン前処理は有意な抑制効果を示さないことが分かった。



(図 1. パクリタキセルによるミクログリアの炎症性サイトカイン産生誘導とアウクビンの効果。パクリタキセル投与により炎症性サイトカインである IL-6 と $\text{TNF}\alpha$ の産生が誘導された。アウクビンはパクリタキセル誘導性のサイトカイン産生の抑制効果を示さなかった。)

【考察と今後の展望】

マウス脳ミクログリア由来細胞株 MG6 細胞を用いた解析より、パクリタキセルはミクログリアに作用し、炎症応答を誘導することが分かった。この炎症応答には、炎症性サイトカインの産生と窒素酸化物の放出が含まれる。ミクログリアより放出された大量の炎症性メディエーターは、周囲の細胞に対し細胞傷害性に作用することが報告されていることから、パクリタキセルは中枢においてミクロ

グリアを介して神経障害を誘導している可能性が示唆される。

パクリタキセル誘導性のミクログリアの炎症応答に対してアウクピンは抑制効果を示さなかった。アウクピンは末梢においてパクリタキセル誘導性の脱髄を抑制する効果が示されており、抗がん剤誘発性の脱髄にはマクロファージを介した機構の存在が考えられているが、中枢においてはアウクピンによるミクログリア活性調節を介した神経障害抑制効果を期待することは難しいと考えられる。一方で、アウクピンは、神経細胞の小胞体ストレス応答性のアポトーシス誘導経路を抑制するとの報告がある。今回、ミクログリアから放出された炎症性メディエーターによる周辺細胞への細胞障害作用に対するアウクピンの保護効果は検討されておらず今後の課題である。

本検討により、パクリタキセルにより中枢系においてミクログリアの炎症応答を誘導することが分かった。今後、炎症誘導経路を解析する予定である。治療標的となりうる分子を見いだすことができれば、パクリタキセル誘導性の末梢神経障害に対する治療法の開発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, 洞口龍介