

## II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）

応用薬理学 安東 嗣 修

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）

産婦人科学 齋藤 滋

がん患者にとって抗がん薬によるがん化学療法は、その治療にとって重要である。しかしながら、抗がん薬の副作用の一つである末梢神経障害は、「手袋—靴下型」の形成分布つまり四肢末端で認められることを特徴とする痛みやしびれなど耐え難い異常感覚を主症状とし、患者のQOL（生活の質）の低下に加え、抗がん薬の投薬中止へと繋がる。したがって、このような末梢神経障害のコントロールは患者にとって重要である。

我々は、これまでにヒトやマウスにおいて漢方方剤 芍薬甘草湯が抗がん薬による末梢神経障害性疼痛に有用であることを見出してきた。そこで、末梢神経障害が、四肢末端で起こることに着目し、芍薬成分のペオニフロリンの外用がマウスにおいて、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することを明らかにしてきた。また、ヒトにおいては、抗がん剤タキソール投与ががん患者に対して芍薬甘草湯投与による臨床評価を運動神経の伝導速度ならびに末梢温度を指標に調べた結果、特にタキソール投与による末梢温度低下に対して芍薬甘草湯が改善効果を示すことが明らかとなった。

本研究では、ペオニフロリンの外用剤開発に向け、前臨床試験として、マウスにおけるパクリタキセル誘発末梢神経障害性疼痛に対するペオニフロリン外用による疼痛憎悪抑制作用機序ならびに、臨床適用外用剤の試作品の効果を検討した。また、臨床では、抗がん薬投与患者への芍薬甘草湯投与による末梢神経伝導速としびれへの影響を検討した。

### 【各班のまとめ】

#### 1. 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討と ペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（応用薬理学：安東嗣修）

マウスへの抗がん薬パクリタキセル単回投与により機械的アロディニア（健常状態において非侵害性である刺激に対して、過敏に反応する状態）が誘発された。そこで、ペオニフロリンのエタノール

溶液を1日2回後肢足蹠に塗布した。その結果、パクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪をペオニフロリンの外用は抑制した。このペオニフロリン外用における機械的アロディニアの憎悪抑制作用の機序として、本研究では末梢神経の髄鞘を形成しているシュワン細胞に着目し、パクリタキセル誘発小胞体ストレスをペオニフロリンがアデノシン A1 受容体の活性化を介して抑制することが一部関与することを明らかにした。

更に、本研究では、実際に臨床適用を考えるべく、ペオニフロリン外用剤の試作品を用い、パクリタキセル投与後に繰り返し塗布すると、パクリタキセル誘発の機械的アロディニアの憎悪が抑制された。したがって、ペオニフロリン外用剤において、その有用性が見出されたことから、今後本剤の安定性や安全性の確認の後、臨床研究に進める目途がたった。

## **2. 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（産婦人科学：齋藤 滋）**

婦人科において、パクリタキセル・カルボプラチン投与がん患者でしびれの自覚症状、筋電計用いた運動神経および知覚神経の伝達速度評価、さらに体表温度についてサーモメーターを用いて体表温度を測定した。本年は、がん患者18症例において検討した。パクリタキセルの累積投与量に応じて、運動神経伝達速度は変化なかったが、知覚神経伝達速度は有意に減少した。この減少はしびれの強さの自覚症状と相関傾向にあった。また、皮膚表面温度も減少傾向を示した。

今回、7例の患者に対して、芍薬甘草湯内服を行うことで、2例にしびれに対する自覚症状が改善した。これら2症例に関して、知覚神経伝達速度および足背の表面温度は明らかな改善効果を認めなかった。芍薬甘草湯におけるしびれの自覚症状改善効果に神経伝導速度ならびに皮膚の表面温度の以外の抑制作用機序の存在が示唆される。今後、ペオニフロリン外用剤の臨床評価を行う上で症例数の累積に加え、評価法の安定性を確立することが必要であると思われた。

## **3. その他（応用薬理学：安東嗣修）**

本剤開発に向け、

- ①富山県内製薬関連企業に、製剤見本の作製を依頼し、作製して頂いた。
- ②臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、「薬都とやまヘルスケア創造プロジェクト 薬事戦略個別相談会」（富山県くすり政策課主催）に参加し、製剤開発ならびに臨床研究等に関して相談を行った。（2016年12月16日）

## Ⅱ－１ 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験

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

### 【研究目的】

抗がん薬の主要な副作用に嘔吐と末梢神経障害がある。嘔吐に関しては、セロトニン 5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬やニューロキニン 1 (NK1) 受容体の拮抗薬が用いられ、その有用性が認められている。一方、末梢神経障害【異常感覚（痛みや痺れなど）】は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではそのコントロールが難しく、抗がん薬投与中止後も1年以上その症状が続く。従って、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

漢方方剤の芍薬甘草湯は、筋肉痛等に用いられ、最近では抗がん薬による末梢神経障害にその有用性が認められてきている。我々は、これまでに、芍薬甘草湯がマウスの抗がん薬誘発末梢神経性異常感覚（機械的アロディニア）を抑制すること並びにその作用が末梢レベルで効いていることを明らかにしてきた。そこで、末梢神経障害が四肢末端で起こることから、芍薬エタノール抽出エキス並びに芍薬の主要成分のペオニフロリンを機械的アロディニア評価部位のマウス後肢足蹠に繰り返し塗布すると、抗がん薬誘発の機械的アロディニアが抑制されることを見出した。本年は、ペオニフロリンによる機械的アロディニアの抑制作用機序に関して検討し、更に臨床で用いることが可能なペオニフロリン外用剤の試作品を用いてその有効性を検討した。

### 【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）

抗がん薬パクリタキセル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 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。

（ペオニフロリン）

ペオニフロリン（和光純薬工業，大阪）は、エタノールに溶解し塗布した。これらエタノール溶

液は、1日2回マウスの後肢の足首より指先側（足掌、足背、指）に塗布した。また、ペオニフロリン外用剤（試作品）は、富山県内の企業Aにより作製して頂いた。

（アデノシン A1 受容体作動薬及び拮抗薬）

アデノシン A1 受容体作動薬 N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA) は、エタノールに溶解し、1日2回パクリタキセル投与翌日より後肢足蹠に塗布した。アデノシン A1 受容体拮抗薬 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) は、1日2回ペオニフロリン塗布30分前に腹腔内注射した。

（行動評価：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)

（ウエスタンブロッティング：小胞体ストレスマーカー CHOP の発現）

パクリタキセルで刺激したシュワン細胞株 LY-PPB6 細胞から常法に従いタンパクを抽出し、ウエスタンブロッティングを行った。1次抗体として抗 CHOP モノクローナル抗体を用い、2次抗体として HRP-結合抗マウス IgG を用い、発光基質と反応させることで X 線フィルムを感光させ、得られたバンドの濃さを評価した。

## 【結果】

### （1）パクリタキセル誘発機械的アロディニアにおけるペオニフロリン外用による抑制効果に対するアデノシン A1 受容体拮抗薬の効果

ペオニフロリンの作用機序の一つにアデノシン受容体活性化作用が報告されている。そこで、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニア憎悪抑制作用にアデノシン A1 受容体が関与しているか検討した。その結果、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニア憎悪抑制作用をアデノシン A1 受容体拮抗薬 (DPCPX) は抑制した。更に、アデノシン A1 受容体作動薬 (CPA) の繰り返し投与は、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。

### （2）シュワン細胞におけるパクリタキセル誘発小胞体ストレスへのペオニフロリンの効果

パクリタキセルによる末梢神経障害の機序に末梢神経の脱髄が報告されている。髄鞘を形成している細胞にシュワン細胞がある。また、パクリタキセルは小胞体ストレスを誘発することが知られている。シュワン細胞株へパクリタキセルを適用すると小胞体ストレスマーカーの CHOP の発現が増大

した。この増大は、ペオニフロリンの前処置により抑制された。更に、このペオニフロリンによる抑制効果にアデノシン A1 受容体が関与しているか検討したところ、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発の CHOP の発現抑制をアデノシン A1 受容体拮抗薬 DPCPX により抑制された。

### (3) ペオニフロリン外用製剤によるパクリタキセル誘発機械的アロディニアへの効果

これまで、ペオニフロリンはエタノールに溶解し、外用してきた。今後、臨床への応用を進めるべくペオニフロリン含有製剤の試作並びに薬効評価を試みた。

ペオニフロリン外用製剤の繰り返し塗布により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。

### 【考察と今後の展望】

これまでにペオニフロリンの外用によりパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪が抑制されること、また、その効果が塗布部局所で起こっていることを示してきた。今回の実験では、ペオニフロリンのパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制作用の機序に関して検討した。過去の文献においてペオニフロリンの作用の一つにアデノシン A1 受容体の活性化が報告されている。そこで、ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪抑制へのアデノシン A1 受容体拮抗薬の効果を検討したところ、アデノシン A1 受容体拮抗薬はペオニフロリンの効果をはほぼ完全に消失した。さらに、アデノシン A1 受容体作動薬自身の塗布においても、ペオニフロリンと同様にパクリタキセル誘発機械的アロディニアの憎悪を抑制した。これらのことから、ペオニフロリンの作用にアデノシン A1 受容体が関与していることが示唆される。また、アデノシン A1 受容体の活性化もまた機械的アロディニアを抑制したことから、ペオニフロリンだけでなくアデノシン受容体作動薬自身もまたパクリタキセル誘発末梢神経障害抑制薬となりうることが期待される。

パクリタキセル誘発の末梢神経障害の作用機序に、末梢神経の脱髄が指摘されている。事実、一昨年の報告にあるようにパクリタキセル投与により後肢足蹠の神経に脱髄が認められ、ペオニフロリンの塗布によりパクリタキセルによる脱髄が抑制された。本年は、更に細胞レベルでの検討を行った。髄鞘の構成細胞はシュワン細胞であることから、シュワン細胞を用いて検討した。パクリタキセルは細胞に小胞体ストレスを起こすことが知られている。そこで、小胞体ストレスマーカー CHOP の発現を指標にパクリタキセルによる細胞障害を評価した。シュワン細胞へのパクリタキセルの投与により CHOP の発現が増加し、ペオニフロリンによりアデノシン A1 受容体を介した経路で抑制された。したがって、ペオニフロリン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は、シュワン細胞の小胞体ストレス抑制作用が関与していることが示唆される。

本年の研究で、ペオニフロリンの抗がん薬誘発末梢神経障害抑制作用機序が明らかとなり、さらにペオニフロリン外用製剤の効果も確認できたことから、今後、臨床試験へのステップアップを試みる

予定である。

### 【その他活動】

臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、

- ①「薬都とやまヘルスケア創造プロジェクト 薬事戦略個別相談会」(富山県くすり政策課主催)に参加し、製剤開発ならびに臨床研究等に関して相談を行った。(2016年12月16日)

### 【論文】

Andoh T., Kobayashi N., Kuraishi Y. Prophylactic repetitive administration of shakuyakukanzoto inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia in mice via peripheral effects. *Trad. Kamp. Med.* 3: 71-74 (2016)

Andoh T., Mizoguchi S., Kuraishi Y. Shakuyakukanzoto attenuates oxaliplatin-induced cold dysesthesia by inhibiting the expression of transient receptor potential melastatin 8 in mice. *J. Trad. Complement. Med.* 7: 30-33 (2017)

Andoh T., Kobayashi N., Uta D., Kuraishi Y. Prophylactic topical paeoniflorin prevents mechanical allodynia caused by paclitaxel in mice through adenosine A1 receptors. *Phytotherapy* 25: 1-7 (2017)

### 【学会発表】

安東嗣修, 小林奈央, 倉石 泰. Inhibitory effect of prophylactic repetitive topical application of paeoniflorin on the exacerbation of paclitaxel-induced mechanical allodynia through the adenosine receptor in mice. 第89回日本薬理学会年会; 2016 Mar 9-11; 横浜.

### 【その他発表】

安東嗣修. 抗がん薬によって誘発される末梢神経障害と漢方薬—その効果と作用機序—. 富山大学和漢医薬学総合研究所 第21回夏季セミナー; 2016 Aug 9-10; 富山.

### 【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

小林奈央, 加藤 充, 倉石 泰

## Ⅱ－２ 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯 並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 産婦人科学

教授 齋藤 滋

### 【研究目的】

高齢化社会への突入により癌罹患率が一貫して増加傾向にあり、現在の日本では2人に1人は、一生のうちに何らかの癌に罹ると言われている。そこで、抗がん剤を含めた化学療法の重要性が増していることに論を俟たない。Evidence Based Medicine の概念に則り有効な抗がん剤が選定され、パクリタキセルがほぼすべての婦人科癌・肺癌・乳癌・胃癌・膵癌など多くの癌種に有効であることが証明され、最も使用頻度の高い抗がん剤となっている。同薬剤は、その投与時間の短さにより、外来での化学療法を可能にした一方で、末梢神経障害の頻度が高いことが知られており、末梢神経障害は同薬剤の減量や中止の指標となっている。しかしながら、末梢神経障害の発生の詳細な機序は未だ明らかとなっておらず、有用な治療薬や治療法がないのが現状である。我々は芍薬甘草湯の芍薬がパクリタキセル誘導の末梢性の痛みに対して有用であることを報告し（Eur. J Pain ; 13 : 22-27, 2009）、臨床例においても芍薬甘草湯がパクリタキセルによる筋肉痛に有用であることを報告している（産婦人科漢方のあゆみ ; 28 : 40-45, 2011）。しかし、これまでの報告は患者による主観的評価法に頼っており、客観的な評価法が求められている。申請代表者である安東らは、電気生理学的手法を用いた検討から、抗がん剤投与マウスの末梢神経において痺れた相当する自家発火が増加していること、ならびに抗がん剤使用後に末梢循環障害が生じ、このことが痛み、痺れにつながることを、世界で初めて見出した。そこで、今回、婦人科がん患者でパクリタキセル製剤を使用する症例に筋電計（T&Tメディカル社ニューロスタディー）を用いて、運動神経および知覚神経の伝達速度評価をおこなった。また体表温度についてサーモメーターを用いて測定した。これらの方法を通して、芍薬甘草湯による末梢神経障害を客観的に評価する方法の確立を目的とした。特に今年度は、患者本人のしびれの自覚的所見と神経伝達速度を中心とした他覚的所見との関係についての検討を行った。

### 【研究方法】

対象を2016年1月～2016年9月の間に当科で新たにパクリタキセル・カルボプラチンによる化学療法を行った婦人科癌症例を対象とした。化学療法は3週間ごとの外来での投与が基本であるため、化学療法当日（day1）に前腕の運動神経伝達速度と知覚神経伝達速度を測定した。また測定時に自覚

症状についてのアンケートを実施，し手足のしびれ，疼痛に対して0-10段階の評価を依頼した。尚，数字の大きいほど自覚症状が強いことを示す。今年度は以下の項目について検討を行った。

①パクリタキセルの累積投与量と神経伝達速度との関係，また自覚症状との関連について検討を行った。

②芍薬甘草湯（内服）の使用前後の各種項目の変化について

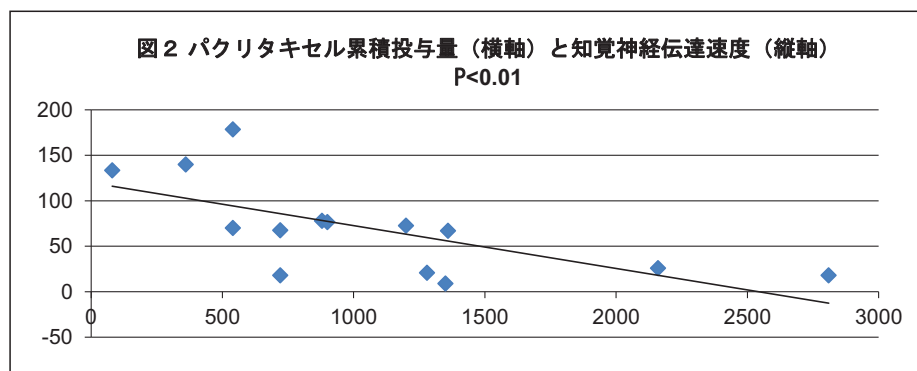
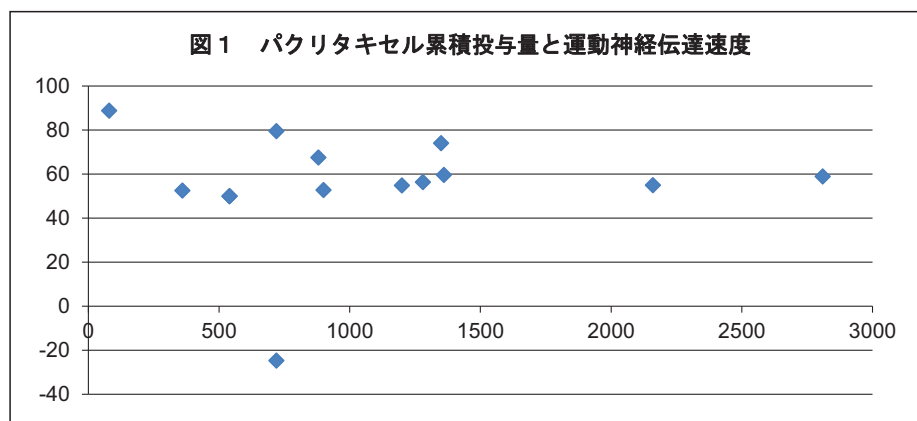
芍薬甘草湯のしびれに対する効果を検討するために，化学療法の1コース目は芍薬甘草湯を使用せず，2コース目以降，服用の希望および同意の得られた患者に対し，芍薬甘草湯を次回化学療法の1日前から7日間，1日7.5gを投薬し，服用前後のしびれ等の自覚症状および神経伝達速度の変化について評価を行った。

### 【成績】

対象は18例，平均年齢は63.0歳，子宮体癌患者が8名，卵巣癌患者が9名，腹膜原発癌患者が1名であった。投与方法としては通常のパクリタキセル・カルボプラチン療法が9名，dose dense パクリタキセル・カルボプラチン療法が9名であった。

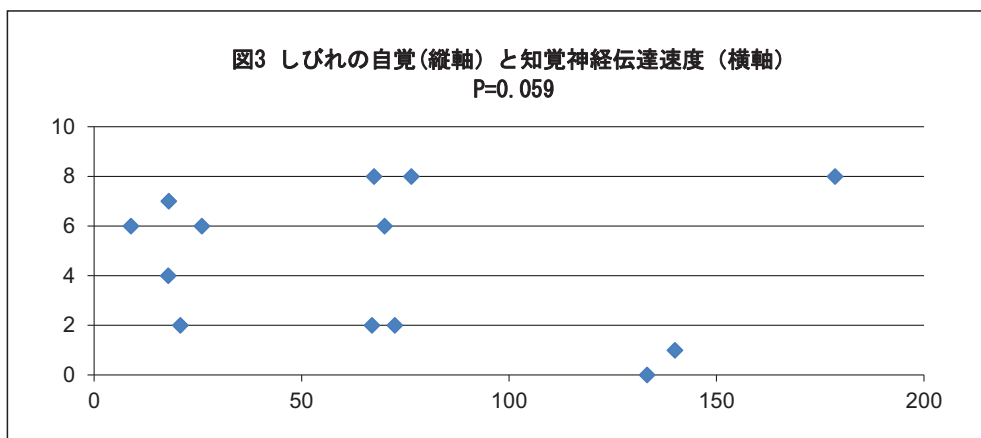
①パクリタキセルの累積投与量と神経障害について

神経伝達速度との関係については運動神経伝達速度については相関関係を認めなかった（図1）が知覚神経伝達速度については負の相関関係を認めた（図2 p 値=0.0037 Spearman の順位相関係数 = -0.7203）。

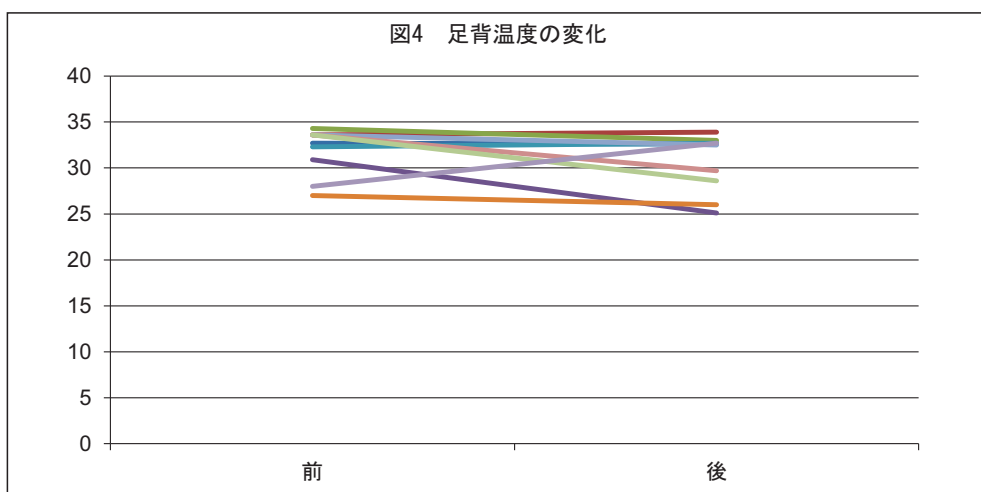




また、しびれの強さと神経伝達速度については運動神経伝達速度については相関関係を認めなかったが知覚神経伝達速度についてはしびれが強いほど伝達速度が低下する傾向を認めた（図3 p値=0.0595 Spearmanの順位相関係数=-0.3217）。

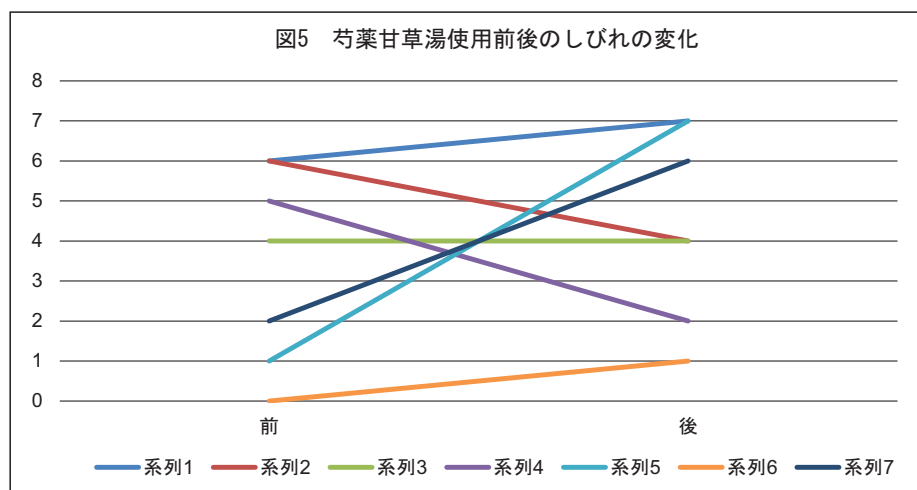


また、パクリタキセル投与の前後で足背温度の低下を認めた症例は10例中6例に認めた（図4 P=0.1）

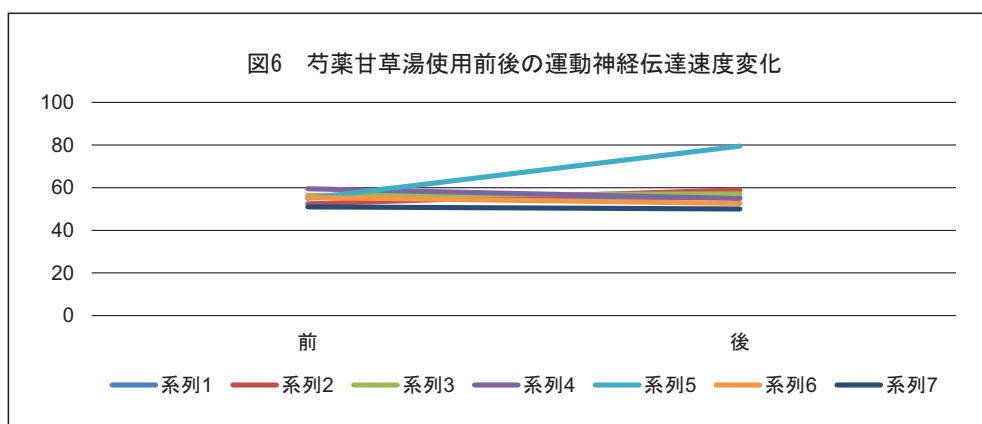


## ②芍薬甘草湯（内服）の使用前後の変化について

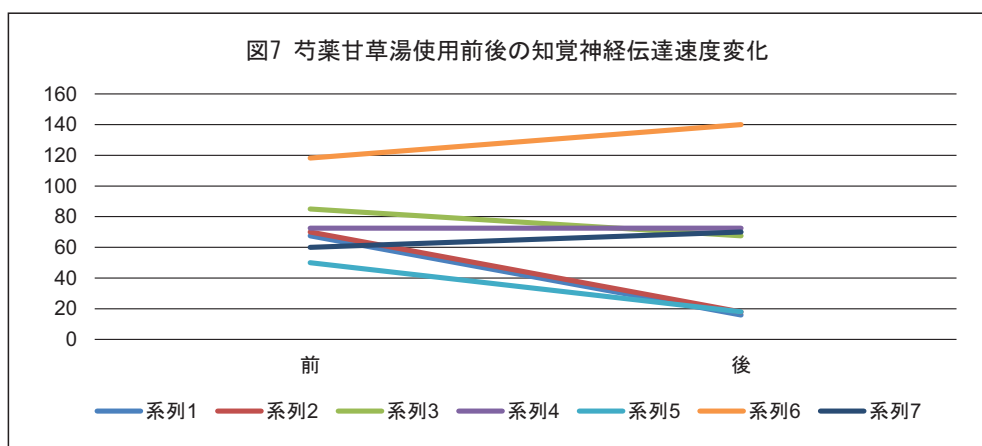
7名の患者における芍薬甘草湯の使用前後での神経伝達速度および自覚症状の変化について検討を行った。



7例のうち、2名は自覚症状の改善、4例は増悪、1例は不変であった。(図5) 服薬前後により、運動神経伝達速度に関して、7例中6例では大きな変化を認めなかった(図6)



一方、知覚神経伝達速度は投与前後で比較して、低下する症例を7例中4例認めた。(図7)



芍薬甘草湯内服の有無でこの知覚神経伝達速度が変化するかを検討するため、同一患者内において、芍薬甘草湯の非服用期間および服用期間の知覚神経伝達時間の変化について、パクリタキセル投与量(mg)あたりで検討した。具体的にはそれぞれの期間に生じた知覚神経伝達時間の差(m/s)を、その期間中に投与したパクリタキセル投与量(mg)で除して算出した。芍薬甘草湯非服用期間では知覚神経伝達時間の変化率が平均で $0.06 \pm 0.28$  m/s/mgであったのに対し、内服あり群では $-0.07 \pm 0.15$  m/s/mgであり、両群間で差を認めなかった( $P=0.2$ )また、サーモメーターを用いた足背表面温度について服薬の有無での変化を検討したが、両群間で差を認めなかった(芍薬甘草湯内服なし群 $-0.5 \pm 0.6$ 度、内服あり群 $-1.4 \pm 2.6$ 度、 $P=0.7$ )

また、特に図5で芍薬甘草湯内服により、しびれの自覚症状が改善した2症例において、知覚神経伝達速度および足背温度の変化について明らかな改善傾向を認めなかった。

## 【考察と今後の展望】

これまで、抗がん剤による痛みや末梢神経障害の評価法は主観的であったが、客観的な評価法を確立し、また芍薬甘草湯による効果が客観的な評価でも証明されれば、臨床的に極めて大きな意義がある。現在、婦人科患者を対象に抗がん剤投与中にしびれの自覚症状のスコアリングおよび神経伝達速度および末梢温度の測定を行っており、症例を蓄積中である。

今回、パクリタキセルの累積投与量の増加につれ、前腕の運動神経伝達速度は変化を認めなかった(図1)が、知覚神経伝達速度が低下する(図2)ことを認めた。また、知覚神経伝達速度としびれの自覚には負の相関傾向を認めた(図3)が、化学療法が交絡因子になっていることも考えられ、症例の蓄積による今後の検討が必要と思われる。

今回、芍薬甘草湯内服による知覚神経伝達速度や足背表面温度の改善は非内服群と比べて差を認めなかった。また、しびれに対する自覚症状の改善は7例中2例と一部の症例にのみ認められた(図5)。これら2症例に関して、知覚神経伝達速度および足背の表面温度は明らかな改善効果を認めなかった。症例数の累積が必要であるが、芍薬甘草湯内服のしびれに対する改善効果は知覚神経や手足表面温度の改善とは異なる機序も想定する必要があるかと思われた。今回は、芍薬甘草湯内服の効果の検討を行ったが、今後、申請代表者の安東らとともに、芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の有効性を検討していきたい。

## 【学会発表】

なし

## 【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部(医学)産婦人科学

吉野 修, 中島 彰俊, 島 友子, 鮫島 梓, 津田 桂