

牛車腎気丸，及び関連漢方方剤の抗癌薬誘発末梢神経障害性疼痛への効果に関する研究

申請代表者	安東 嗣修	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	准教授
所外共同研究者	倉石 泰	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	教授
〃	ブナム ガウチャン	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	大学院生
〃	北村 亮	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	大学院生
〃	緒方 孝行	富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)応用薬理学	薬学部4年生
所内共同研究者	小松かつ子	資源開発部門 生薬資源科学分野	教授
〃	柴原 直利	臨床科学部門 漢方診断学分野	教授
〃	伏見 裕利	民族薬物研究センター 民族薬物資料館	特命准教授
〃	条 美智子	臨床科学部門 漢方診断学分野	助教
〃	白 焱晶	資源開発部門 生薬資源科学分野	研究員

【報告セミナー要旨】

癌患者の痛みは、癌の直接あるいは間接的原因によるものに加え、癌の治療に起因するものがある。癌化学療法時に使用されるビンカアルカロイド系、タキサン系、白金錯体の抗癌薬のいくつかは、投与開始直後あるいはある程度の期間を経て末梢神経障害を副作用として発現する。その症状としては、疼痛や痺れ、麻痺等が挙げられる。このような末梢神経障害は、患者の闘病生活に支障を与え、場合によっては投薬拒否あるいは中止の原因にもなっている。このような抗癌薬誘発性末梢神経障害は、既存の鎮痛薬でのコントロールは非常に難しく、有用な治療薬がないのが現状である。

最近、我々は抗癌薬（パクリタキセル，オキサリプラチン，ビンクリスチン）投与により疼痛様行動を誘発するマウスモデルの作出に成功した。そこで、本研究では、これらマウスモデルを用いて漢方方剤牛車腎気丸とその関連方剤（八味地黄丸と六味丸）の効果を検討した。

パクリタキセル，オキサリプラチン及びビンクリスチンのマウスへの単回腹腔内注射により、注射後それぞれ14日，10日及び14日をピークとして機械的アロディニア（von Freyフィラメント刺激による疼痛様過過敏反応）を生じた。機械的アロディニアのピーク時に牛車腎気丸とその関連方剤（八味地黄丸と六味丸）を経口投与すると、投与後30分をピークとしてこれら方剤はオキサリプラチン誘発機械的アロディニアを抑制したが、パクリタキセル及びビンクリスチン誘発の機械的アロディニアは抑制しなかった。オキサリプラチン誘発機械的アロディニアに対する牛車腎気丸とその関連方剤（八味地黄丸と六味丸）の効果を比較すると牛車腎気丸がもっとも抑制効果が顕著であった。そこで、牛車腎気丸を抗癌薬注射翌日より1日1回繰り返し経口投与するとパクリタキセル及びオキサリプラチン誘発機械的アロディニアを抑制した。一方、ビンクリスチン誘発機械的アロディニアは抑制されなかった。繰り返し牛車腎気丸投与の効果が末梢神経レベルでの効果かどうか電気生理学的に解析した。マウス後肢親指側甲を主に支配する伏在神経から神経活動を記録した。牛車腎気丸の繰り返し投与した各抗癌薬処置マウスにおける受容野への von Frey フィラメントなどの刺激による神経発火は、溶媒投与マウスと比べて変化はなかった。このことは、牛車腎気丸の抗癌薬誘発末梢神経障害性疼痛抑制効果が中枢レベルで制御されている可能性が示唆される。

抗癌薬は、その投与時期が明確であることから牛車腎気丸を抗癌薬（特にパクリタキセルやオキサリプラチン）投与と同時期に服用することで、末梢神経障害の予防になると考えられる。牛車腎気丸の末梢神経障害性疼痛抑制機序の解明に加え、癌移植マウスへの抗癌薬との併用投与による抗癌作用や癌性及び末梢神経障害性疼痛に対する効果を今後検討する予定である。

■背景・目的

癌患者の痛みは、癌の直接あるいは間接的原因によるものに加え、癌の治療に起因するものがある。癌化学療法時に使用されるビンカアルカロイド系、タキサン系、白金錯体の抗癌薬のいくつかは投与開始後ある程度の期間を経て末梢神経障害を副作用として発現させる。その症状としては、疼痛や痺れ、麻痺等が挙げられる。このような末梢神経障害は、患者の闘病生活に支障を与え、場合によっては投薬拒否の原因にもなっている。更に、近年、抗癌薬の投薬治療が通院で出来ることになっているが、抗癌薬による神経障害のため、衣服ボタンがつけられない、薬によっては冷刺激に敏感になり水仕事ができない、平地でもつまずくなど日常生活に支障を来している。しかしながら、未だ有効な治療法は確立されておらず、投薬中止の措置が採られているが、措置実施後も症状が持続又は悪化することも少なくない。これら抗癌薬の中には癌治療において高い有用性を示すものも多く、疼痛を始めとしたこれらの末梢神経障害への有効な治療法・治療薬の開発が期待されている。

癌化学療法による副作用では、主に嘔吐と上記に示すように末梢神経障害が知られている。嘔吐は、5-HT₃セロトニン受容体拮抗薬やNK1ニューロキニン受容体拮抗薬などが予防的に投薬され、一定の効果を発揮している。一方、末梢神経障害は、その発生機序が解明されていないことから、既存の鎮痛薬等の効果は小さく、機序の解明と治療薬の開発が待たれている。その原因のひとつに、機序の解明や末梢神経障害に有用な治療薬のスクリーニングに有用な動物モデルと評価法の欠如が挙げられる。我々は、これまでにビンクリスチン（ビンカアルカロイド系）、パクリタキセル（タキサン系）、オキサリプラチン（白金錯体）の3種の異なる抗癌薬をマウス腹腔内単回注射して1-2週間後をピークとする疼痛モデルを作出した（Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009）。これらモデル系に対して、抗てんかん薬ガバペンチンの経口投与は、ビンクリスチン誘発疼痛には効果を示さなかったが、パクリタキセルやオキサリプラチン誘発疼痛を抑制した（Gauchan et al., Bio. Pharm. Bull., 2009）。この効果は、ガバペンチンの作用点であるカルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ -1サブユニットの発現に依存することを明らかにした。また、パクリタキセルやオキサリプラチン処置マウスでは血流が減少していること、ビンクリスチン処置マウスでは血流は変化しないことを見出した（Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009）。血流改善薬リマプロスト（プロスタグランジンE1アナログ）が、ビンクリスチン誘発疼痛には影響しないが、パクリタキセル並びにオキサリプラチン誘発疼痛および血流を改善することを見出した（Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009）。さらに、オキサリプラチン投与患者のほぼ全てが冷刺激に対する痛覚過敏を訴える。このことに対して温度感受性チャンネルの一つであるTRPM8の一次感覚神経での発現増加が関与することを明らかにした（Gauchan et al., Neurosci. Lett., 2009）。

近年、臨床において、パクリタキセル誘発の末梢神経障害に対して、漢方方剤の牛車腎気丸が処方される場合がある。しかし、その治療効果の有用性に関してのエビデンスはない。そこで、本研究では、我々の作出した抗癌薬誘発性疼痛マウスモデルを用いて牛車腎気丸及び関連方剤の疼痛抑制効果に関して検討した。

■結果・考察

(使用漢方方剤：ツムラ)

- ・牛車腎気丸
- ・八味地黄丸
- ・六味丸
- ・麻黄附子細辛湯

上記漢方方剤構成生薬は、表1に示す。

表 1. 使用漢方方剤の構成生薬

漢方方剤名	構成生薬名 (components)												
	地黄	山茱萸	山薬	沢瀉	茯苓	牡丹皮	桂皮	附子	車前子	牛膝	麻黄	細辛	
牛車腎気丸 Goshajinkigan													
八味地黄丸 Hachimijiogan													
六味丸 Rokumigan													
麻黄附子細辛湯 Mao-bushi-saishin-to													

抗瘍薬誘発性疼痛マウスモデル

使用実験動物：雄性c57BL/6系マウス

疼痛評価：von Frey フィラメントをマウス後肢足蹠に軽くあて、その時生じる疼痛様反応をスコア化（スコア0：無反応あるいは後肢の左右への移動、スコア2：後肢の腹部方向への引き挙げ動作、スコア3：後肢の振り動作あるいは舐め動作）することにより評価した。

○パクリタキセル誘発性疼痛マウスモデル

パクリタキセル（5mg/kg）をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後14日目をピークとする疼痛様反応の増大を認めた。薬物注射後42日目には溶媒注射コントロールと同程度にまで回復した。

○オキサリプラチン誘発性疼痛マウスモデル

オキサリプラチン（3mg/kg）をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後10日目をピークとする疼痛様反応の増大を認めた。薬物注射後28日目には溶媒注射コントロールと同程度にまで回復した。

○ピンクリスチン誘発性疼痛マウスモデル

ピンクリスチン（0.1mg/kg）をマウスに単回腹腔内注射すると、投与後14日目をピークとする疼痛様反応の増大を認めた。薬物注射後35日目には溶媒注射コントロールとほぼ同程度にまで回復した。

以降の実験では、上記3つの抗瘍薬誘発性疼痛マウスモデル及び疼痛評価法を用いることにした。

抗癌薬誘発性疼痛に対する牛車腎気丸, 八味地黄丸, 六味丸および麻黄附子細辛湯の単回投与の効果:
表2

漢方方剤：各種漢方方剤は、5%アラビアゴム水溶液に溶解し、パクリタキセルおよびビンクリスチン注射マウスでは注射後14日目に、オキサリプラチン注射マウスでは注射後10日目に経口投与した。

疼痛評価：von Frey フィラメントを用いた評価

○牛車腎気丸の単回投与の効果

オキサリプラチン誘発性疼痛反応に対して、牛車腎気丸 (0.1, 0.3, 1g/kg) は溶媒投与群と比べて用量依存的に投与後30分をピークとして疼痛反応の抑制効果を示した。この抑制効果は、投与後2時間後にはほぼ消失した。

一方、牛車腎気丸の単回投与は、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性疼痛に対して抑制効果を示さなかった。

○八味地黄丸の単回投与の効果

八味地黄丸は、牛車腎気丸から車前子および牛膝を除いた生薬構成となっている。オキサリプラチン誘発性疼痛反応に対して、八味地黄丸 (0.1, 0.3, 1g/kg) は溶媒投与群と比べて用量依存的に投与後30分をピークとして疼痛反応の抑制効果を示した。この抑制効果は、投与後2時間後にはほぼ消失した。また、最大抑制効果は、牛車腎気丸投与の場合と比べて約40%減弱した。

一方、八味地黄丸の単回投与は、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性疼痛に対して抑制効果を示さなかった。

○六味丸の単回投与の効果

六味丸は、八味地黄丸から桂皮および附子を除いた生薬構成となっている。オキサリプラチン誘発性疼痛反応に対して、六味丸 (0.1, 0.3, 1g/kg) は溶媒投与群と比べて用量依存的に投与後30分をピークとして疼痛反応の抑制効果を示した。この抑制効果は、投与後2時間後にはほぼ消失した。また、最大抑制効果は、八味地黄丸の投与の場合とほぼ同程度であった。

一方、六味丸の単回投与は、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性疼痛に対して抑制効果を示さなかった。

○麻黄附子細辛湯の単回投与の効果

牛車腎気丸の構成生薬の一つであり、疼痛抑制を示すことが知られている附子を含む麻黄附子細辛湯 (0.1, 0.3, 1g/kg) は、パクリタキセル、オキサリプラチンおよびビンクリスチン誘発性疼痛反応を抑制しなかった。

表2. 各種抗癌薬誘発性疼痛に対する各種漢方方剤単回投与の効果

	Paclitaxel	Oxaliplatin	Vincristine
牛車腎気丸 Goshajinkigan	➡	⬇️⬇️	➡
八味地黄丸 Hachimijiogan	➡	⬇️	➡
六味丸 Rokumigan	➡	⬇️	➡
麻黄附子細辛湯 Mao-bushi-saishin-to	➡	➡	➡

↓：疼痛抑制，→：効果なし

抗癌薬誘発性疼痛に対する牛車腎気丸の連続投与の効果：表3

漢方方剤：牛車腎気丸は、5%アラビアゴム水溶液に溶解し、パクリタキセル、オキサリプラチンおよびビンクリスチン注射の翌日より、1日1回経口投与した。

疼痛評価：疼痛評価は、毎日漢方方剤投与前に von Frey フィラメントを用いて評価した。

○牛車腎気丸の連続投与の効果

パクリタキセルおよびオキサリプラチン誘発性疼痛反応に対して、牛車腎気丸（0.1, 0.3, 1g/kg）の1日1回の連続投与は溶媒投与群と比べて用量依存的に疼痛反応の抑制効果を示した。この抑制効果は、オキサリプラチン誘発性疼痛に対してより顕著であった。

一方、牛車腎気丸の連続投与は、ビンクリスチン誘発性疼痛に対して抑制効果を示さなかった。

表 3. 各種抗癌薬誘発性疼痛に対する牛車腎気丸連続投与の効果

	Paclitaxel	Oxaliplatin	Vincristine
牛車腎気丸 Goshajinkigan	↓	↓	→

↓：疼痛抑制，→：効果なし

抗癌薬投与マウ末梢神経活動に対する牛車腎気丸の連続投与の効果

牛車腎気丸の効果が末梢レベルで効果を示しているかどうか調べるために、末梢神経活動を指標として電気生理学的に解析を行った。

漢方方剤：牛車腎気丸は、5%アラビアゴム水溶液に溶解し、パクリタキセル、オキサリプラチンおよびビンクリスチン注射の翌日より、1日1回経口投与した。

末梢神経活動評価：ペントバルビタール麻酔下、マウス伏在神経を露出し、双極電極を用いて末梢神経活動を記録した。末梢神経活動評価は、パクリタキセルおよびビンクリスチンは注射後14日目に、オキサリプラチンは10日目に評価した。

○自発的神経発火に対する牛車腎気丸の連続投与の効果

牛車腎気丸は、オキサリプラチン誘発の自発的神経発火を有意に抑制した。一方、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発の自発的神経発火は抑制しなかった。

○von Frey フィラメント刺激誘発神経発火に対する牛車腎気丸の連続投与の効果

牛車腎気丸は、パクリタキセル、オキサリプラチンおよびビンクリスチン注射マウスでの von Frey フィラメント刺激誘発神経発火を抑制しなかった。

牛車腎気丸、八味地黄丸および六味丸の成分解析

オキサリプラチン誘発性疼痛に対する牛車腎気丸の疼痛抑制効果が、八味地黄丸や六味丸に比べて大きかった。牛膝および車前子の除去が疼痛抑制効果に影響している可能性が認められたため、まず、HPLC-UV法により牛車腎気丸、八味地黄丸や六味丸の成分分析を行い、更に車前子の成分と比較した。UV240nmおよびUV280nmでの検出において、牛車腎気丸と車前子に認められ、八味地黄丸や六味丸に認められなかった3つの顕著な大きさのピークを検出した。今後、この成分をさらに解析する予定である。

本研究では、異なる抗癌作用機序を有する3つの抗癌薬の投与によって誘発される疼痛マウスモデル (Gauchan et al., J. Pharmacol. Sci., 2009) を用いて牛車腎気丸、八味地黄丸、六味丸および麻黄附子細辛湯の疼痛反応抑制効果を検討した。単回投与では、パクリタキセルおよびビンクリスチン誘発性疼痛に対して、使用したすべての漢方方剤では抑制効果が認められなかった。一方、オキサリプラチン誘発性疼痛反応に対して、牛車腎気丸、八味地黄丸及び六味丸が抑制効果を示した。しかし、麻黄附子細辛湯は、疼痛抑制効果を示さなかった。牛車腎気丸、八味地黄丸および麻黄附子細辛湯には附子が含まれている。一般に附子は鎮痛作用を示すことが知られているが、麻黄附子細辛湯に抗癌薬誘発性疼痛に対して抑制効果を示さなかったことから、附子がオキサリプラチン誘発性疼痛反応抑制効果に寄与していないことが示唆される。また、牛車腎気丸から牛膝および車前子を除いた八味地黄丸の効果が、牛車腎気丸より個々の構成生薬の投薬量が多いにも関わらず、疼痛抑制効果が約40%も減弱したことから、牛膝および車前子の成分に疼痛抑制効果を示す成分や増強する成分が含まれているかもしれない。HPLC-UV法による成分比較において、車前子の成分との比較により、八味地黄丸および六味丸に含まれてなく、牛車腎気丸に含まれている成分が3つピークとして検出されている。これらの解析により疼痛コントロールに有用な成分が同定できる可能性がある。

抗癌薬投与は、その投与開始時期が明確である。そこで、抗癌薬投与開始の翌日より繰り返し投与することで疼痛抑制ができるか検討した。牛車腎気丸の繰り返し投与は、オキサリプラチンに加え、パクリタキセル誘発性疼痛反応を抑制した。Von Freyフィラメント刺激による末梢神経活動増大作用に対して、牛車腎気丸の繰り返し投与は、パクリタキセルおよびオキサリプラチン投与マウスに対して、抑制効果を示さなかった。このことは、牛車腎気丸の疼痛抑制効果が末梢レベルでなく中枢レベル起きている可能性を示唆する。牛車腎気丸の疼痛抑制機序に関して、正確なエビデンスはないが中枢レベルでの下行性疼痛抑制系の賦活化が指摘されているため、今後、下行性疼痛抑制系に関与するセロトニンやノルアドレナリンやその代謝物の濃度比較や行動薬理学的に拮抗薬を用いた評価などを行いその関与を検討する予定である。

本研究成果で、電気生理学的解析の中で牛車腎気丸がオキサリプラチン投与マウスの伏在神経の自発発火 (通常はほとんど起らない) の増大に対して有意な抑制効果を示すことを見出した。抗癌薬投与患者の末梢神経障害の症状中で不快な感覚の一つに痺れがある。痺れは、自発的な異常な感覚である。この自発発火が、痺れ感覚を現すと仮定すると牛車腎気丸がそれを抑制することは、牛車腎気丸の投与は、オキサリプラチン投与患者にとって末梢神経障害予防という観点で非常にメリットがあると考えられる。

本研究では、牛車腎気丸が抗癌薬の種類によって疼痛抑制を示す場合と示さない場合があることを示した。その効果の機序として、主に中枢レベルで起きていると考えられるが、有効成分分析と共に今後さらなる解析が必要であろう。また、今回は、健常マウスに抗癌薬を投与し、実験を行った。今後、担瘤マウスモデルを用いて、抗癌薬ならびに漢方方剤の併用による効果に関して更なる検討をする必要がある。

■結論

抗癌薬 (特に、パクリタキセル並びにオキサリプラチン) 投与開始時期からの牛車腎気丸投与により末梢神経障害の誘発が予防できると期待される。