

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

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

【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。

これまでの検討で、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、このモデルを用いて漢方方剤の牛車腎気丸が本疼痛様反応を抑制すること、すなわち抗アロディニア作用を示すこと明らかにする²とともに、牛車腎気丸の構成生薬である車前子が抗アロディニア作用に重要な役割を果たすことを見出した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及び主にイリドイド3を含む画分は、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⁵。これらの結果から、3は車前子の抗アロディニア作用成分の一つであることが示唆されていたが、これを証明するためには、高純度の3を用い、動物実験にて評価する必要がある。しかし、車前子から得られる量は少なかつたため、3を含む他の生薬を調査したところ、昨年度の研究において、生薬「蔓荊子」に3

が含まれることがわかった。今年度は、蔓荊子から動物実験に必要な量の **3** を確保することをめざし、大量スケールでの分離精製を行い、得られた **3** を用いて抗アロディニア作用の評価を行った。

【方法】

蔓荊子からの成分の分離精製

マンケイシ（広西壮族自治区産，Lot. 024018001）は栃本天海堂から入手した。粉碎後，篩（80 メッシュ）をかけ，32 kg の粉末を得た。これを 216 L のヘキサンに浸し，脱脂を行った。脱脂後の残渣をエタノール 96 L で 3 日間，室温で抽出した。エタノールを減圧濃縮により留去し，エタールエキス（軟調エキス）を 5.4 kg 得た。さらに残渣を 50%エタノール 80 L で 3 日間室温で抽出した後，減圧濃縮により留去し 85 g の乾燥エキスを得た。両抽出物を水に懸濁させて，合成吸着樹脂であるダイヤイオン HP-21 カラム（1.1 kg，92×290 mm）に付し，水（6L），5%メタノール（10L），20%メタノール（10L），メタノール（10L），アセトン（10L）で溶出する操作を繰り返し行った。得られた 5%メタノール溶出画分（20.9 g）および 20%メタノール溶出画分（13.5 g）をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（90×350 mm）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。クロロホルム–メタノール–水（92：8：0.1–90：10：0.1）にかけて溶出した画分を ODS–MPLC（SNAP Ultra C18 12g，42×150 mm，0-1%メタノール）にて分画した。さらに C30 カラム（Develosil C30-UG-5，20×250 mm，20×50 mm のガードカラム付き）を用い，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 の条件で分取 HPLC（グラジエント条件：0–30 分；3%B，30–60 分；3–25%B）を行った。その結果，pedicularis-lactone (**3**，42.5 mg， t_R 30 分)，iridolactone (**4**，298 mg， t_R 18 分)を得た。質量分析および核磁気共鳴スペクトルデータを文献値⁶と比較することにより上記の化合物であることを同定した。

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, 2.0×150 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 (0-1min), 1-10% B (1-20 min), 10-100% B (20-30 min).

Sample injection: 5 μ L

Detection: 190-400 nm for UV, m/z 100-1000 for MS.

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 0.7–0.8 mL の内標準液に溶解させ、NMR 用試料とした。このうち 0.6 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。各試料の純度は、以下の式に従い算出した。

$$\text{Purity}_s (\%) = \frac{S_s}{S_{DSS}} \times \frac{N_{DSS}}{N_s} \times \frac{M_s}{M_{DSS}} \times \frac{C_{DSS}}{C_s} \times P_{DSS} \times 100$$

S_s : 試料のシグナル強度 (積分値)

M_s : 試料の分子量 (3, 184.19)

S_{DSS} : DSS のシグナル強度 (積分値)

M_{DSS} : DSS の分子量 (244.35)

N_s : 試料の定量に用いたシグナルのプロトン数 (1)

C_s : 試料の濃度

N_{DSS} : DSS の定量に用いたシグナルのプロトン数 (9)

C_{DSS} : DSS の濃度 (0.5631 mg/mL)

P_{DSS} : DSS の純度 (92.3%)

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。試料は 15 mg/kg の投与量とし、0.1 mL/体重 g となるように 5%アラビアゴムを含む水で懸濁させ、パクリタキセル投与の翌日から 1 日 1 回投与した。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、パクリタキセル投与日および投与後 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14 日目に評価した。評価は左右の足それぞれについて 3 回ずつ行った。

単離成分の小胞体ストレスに対する影響の評価

シュワン細胞株 (LY-PPB6) は、理研 BRC より入手し、10% FBS 含有 DMEM で培養した。6 cm ディッシュで 80-90%になるまで培養したものを実験に用いた。FBS を含まない 1%BSA 含有 DMEM に交換した後、10 µg/mL の終濃度で化合物を添加し、前処置を 1 時間行った。さらにパクリタキセルを終濃度 10 µM で添加し、24 時間培養を行った。常法に従いタンパクを抽出し、ウェスタンブロットにより CHOP の発現を検討した。

【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の結果であり、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。昨年度の研究において、生薬「蔓荊子」に**3**が含まれることがわかった。そこで、本研究では、蔓荊子から**3**の分離精製を行った。

蔓荊子からの成分の分離精製

蔓荊子を粉碎し、得られた粉末をヘキサンにて脱脂した後、エタノールおよび50%エタノールで順次抽出を行い、エタノール抽出物および50%エタノール抽出物を得た。両抽出物をそれぞれ水に懸濁させて、合成吸着樹脂であるダイヤイオン HP-21 カラムに付し、水-メタノールの混合溶媒を用いメタノールの比率を増加させ溶出させた。LC/MSにより各溶出液を分析したところ、5%および20%メタノール溶出画分に**3**が存在することが確認された。それらを合わせて、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム-メタノール-水の混合溶媒で溶出させた。**3**は、クロロホルム-メタノール-水 (92 : 8 : 0.1-90 : 10 : 0.1) にかけて溶出した画分に検出されたことから、これらを混合し ODS カラムを用いた MPLC にて分画し、さらに C30 カラムを用いた HPLC にてくり返し精製を行うことで pedicularis-lactone (**3**) を得るとともに、iridolactone (**4**)を得た。

単離成分の純度測定

精製した**3**について、定量 $^1\text{H NMR}$ により純度を検討した。精製した画分においてシグナルの分離が良好であった6位水素のシグナル ($\delta_{\text{H}} 5.40, 1\text{H}$) を用いた。本化合物は得られた量が少量であったため、1回のみ ($n=1$) 実験を行った。定量の結果、**3**の純度は67.1%であることが分かった。

単離成分の抗アロディニア作用の評価

次に、**3**について抗アロディニア作用を検討した。**4**は、抗アロディニア作用を示さないことをすでに確認しているため、今回試験を行わなかった。これまでの研究において、**3**を主に含む画分 (**3**の含量 13.4%) は、100 mg/kg の連続経口投与量においてパクリタキセルにより誘発される機械的アロディニアを有意に抑制すること、30 mg/kg において抑制する傾向があることがわかっている⁵。純度を考慮すると**3**は13.4-4.0 mg/kg 程度の投与量で抗アロディニア作用を示すと考えられた。したがって15 mg/kg の投与量であれば十分に活性を確認することができると考え、投与量をこれに設定した。

パクリタキセル投与により、痛み関連スコアは経日的に増加し、パクリタキセル投与後14日目に最大値を示した。これに対し、**3**の連続経口投与を行うと、パクリタキセル投与後7日目以降、痛み関連スコアの増加は有意に抑制された。また、この抑制は試験期間内ほとんど上昇することはなく、14日目においてパクリタキセル投与群の痛みスコアは1.58であるのに対し、**3**の投与群では0.17と低値

を示した。以上の結果は、**3** が経口投与により抗アロディニア作用を示すことを示唆する。(前述の定量 NMR で算出した純度を考慮すると、精製した **3** の 15 mg/kg での投与は、10.1 mg/kg に相当することになる。)

単離成分の小胞体ストレスに対する影響の評価

安東らは、車前子から見出したイリドイド化合物である **1** は、マウスへの腹腔内投与により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を報告している³。また末梢神経の髄鞘を形成するシュワン細胞の小胞体ストレスがパクリタキセル誘発機械的アロディニアに関与すること、**1** がこのパクリタキセルにより誘発される小胞体ストレスを抑制することを報告している⁷。**3** は **1** と類似する骨格構造を持っており、同様の作用を持つことが推測された。そこで、**3** のシュワン細胞における小胞体ストレスマーカーである CHOP 発現への影響を調べた。**3** (10 µg/mL) はパクリタキセル (100 µM) により誘発された CHOP の発現を抑制せず、その発現を 1.6 倍上昇させた。このことからこれら化合物は **1** と異なる機序で抗アロディニア作用を示すことが示唆された。

活性成分を含むことが期待される生薬の基原植物の富山県内での採取

富山県内において車前子の基原であるオオバコの種子と、蔓荊子の基原であるハマゴウの種子を採取した。昨年はオオバコ種子を富山県内の 3 か所 (富山市池田, 富山市杉谷, 立山町利田) にて採取を行ったが、今年度は、朝日町 2 か所で採取を行った。また、**3** が含まれるハマゴウについても黒部市石田浜, 氷見市松田江キャンプ場の 2 か所の海岸で新たに採取を行った。現在、LC/MS による **1** および **3** の定量法の開発を進めており、定量法が確立でき次第、これらの植物サンプル中の **1** および **3** の定量を行う予定である。

【結論・まとめ】

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イド化合物 **1** 及び **3** を見出していた。**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、純度の高い **3** を得て、薬理活性試験に供する目的で、**3** を含む蔓荊子からの分離精製を行った。その結果、純度の高い **3** を単離することができた。**3** についてマウスモデルで評価したところ、抗アロディニア作用が認められた。以上のことから、車前子から見出していた **3** が確かに抗アロディニア作用を持つことを確認することができた。蔓荊子は鎮痛を目的とする処方に用いられる生薬である。蔓荊子を含む漢方方剤はこれまで抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛に対しては用いられていなかった。今回の検討で抗アロディニア作用を持つイリドイド化合物 **3** が蔓荊子に含まれていることを見出した。このこ

とは、蔓荊子を含む漢方方剤の抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛に対する有用性を示唆するものである。また、これら化合物は熱水抽出物よりエタノール抽出物に多く含まれることがこれまでの検討でわかっていることから、蔓荊子のエタノール抽出物は、抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛に対する単味エキス製剤として有効である可能性が期待できる。

抗アロディニア作用を示す **1** および **3** を含む車前子の基原植物であるオオバコ、および抗アロディニア作用を示す **3** を含む蔓荊子の基原植物であるハマゴウは、富山県内で自生している。つまりこれらは県内において栽培が可能な植物である。本研究は、抗アロディニア作用が期待できるこれらを基原とする生薬を富山県内で生産できる可能性を示唆するものである。

【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 3 年（生薬資源科学分野）
黒川葉好 富山大学薬学部 4 年（応用薬理学研究室）

【発表論文】

Toume, K.; Hou, Z.; Yu, H.; Kato, M.; Maesaka, M.; Bai, Y.; Hanazawa, S.; Ge, Y.; Andoh, T.; Komatsu, K., Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen, a crude drug ingredient of Kampo formula “Goshajinkigan”. *J Nat Med* **2019**, 73, 761–768.

【学会発表など】

1. Yu Huanhuan, 當銘一文, 前坂美紀, 安東嗣修, 小松かつ子. Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen and Vitis Fructus. 第 36 回和漢医薬学会学術大会 ; 2019, Aug 31-Sept 1 ; 富山.
2. 當銘一文, 講演「牛車腎気丸の構成生薬「シャゼンシ」からの抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛を抑制する成分の探索研究」 富山大学和漢医薬学総合研究所 第 24 回夏期セミナー ; 2019, Aug 8 ; 富山.

【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 (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, 293-297.
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. *The Japanese Pharmacopeia, 17th edn.* Ministry of Health, Labour and Welfare, **2016**, 1517.
5. Toume, K.; Hou, Z.; Yu, H.; Kato, M.; Maesaka, M.; Bai, Y.; Hanazawa, S.; Ge, Y.; Andoh, T.; Komatsu, K., Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen, a crude drug ingredient of Kampo formula “Goshajinkigan”. *J Nat Med* **2019**, 73, 761–768.
6. 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.
7. 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.